

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
katedra biologických a lékařských věd

**Vliv Sunitinibu na expresi eNOS u normotenzivních
a hypertenzivních potkanů**

Effect of Sunitinib on the expression of eNOS in normotensive
and hypertensive rats

(diplomová práce)

Vedoucí diplomové práce: PhDr. Zdeňka Kudláčková Ph.D.

„Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

Datum:

Podpis:

Poděkování

Děkuji paní PhDr. Zdeňce Kudláčkové, PhD. za velkou ochotu, podporu, vstřícnost, odbornou pomoc a veškerý čas strávený konzultacemi a úpravami diplomové práce. Také bych chtěla poděkovat panu Doc. PharmDr. Petru Nachtigalovi, PhD. a postgraduálním studentům za odborné vedení, cenné rady a příjemnou spolupráci při práci v imunohistochemické laboratoři. Na závěr bych také chtěla poděkovat rodinným příslušníkům, přátelům a známým, kteří mě jakýmkoliv způsobem podporovali.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra Katedra biologických a lékařských věd

Kandidát **Simona Loutocká**

Konzultant **PhDr. Zdeňka Kudláčková Ph.D.**

Název diplomové práce **Vliv Sunitinibu na expresi eNOS u normotenzivních a hypertenzivních potkanů**

CÍL: Sledovali jsme expresi eNOS v aortě u spontánně hypertenzivních potkanů (SHR) a normotenzivních (WKY) potkanů s ohledem na podávání cytostatika sunitinibu. Tzn., zda při podávání sunitinibu dochází ke vzniku cévní endotelové dysfunkce.

ÚVOD: Podávání sunitinibu má značné toxické účinky na lidský organismus. V mnoha případech může zhoršovat vlastní onemocnění, což vede buď ke snížení dávek podaného léčiva, nebo k přerušení léčby. Nejčastějším a nejvýznamnějším nežádoucím účinkem je arteriální hypertenze.

METODY: V práci jsme porovnávali mezi sebou dvě skupiny zvířat: hypertenzivní SHR inbrední samce a normotenzivní WKY inbrední samce. Obě tyto skupiny byly rozděleny ještě na dvě podskupiny. Zatímco první skupině zvířat byl podáván od počátku sunitinib, druhá skupina zvířat sloužila jako kontrola a byla jim podávána pouze voda. U skupiny SHR potkanů podávání sunitinibu probíhalo ve schématu: 8 týdnů podávání, 5 týdnů pauza a následně 8 týdnů podávání. U WKY potkanů z hlediska objevení příznaků toxicity byla poslední fáze zkrácena ve schématu: 8 týdnů podávání, 5 týdnů pauza a 2 týdny podávání. K detekci exprese eNOS jsme využili metodiky En Vision. K posouzení rozdílů mezi sledovanými skupinami jsme použili stereologické hodnocení.

VÝSLEDKY: V rámci imunohistochemické analýzy byla prokázána exprese eNOS u obou druhů zvířat, a to pouze v endoteliálních buňkách. Exprese eNOS byla detekována u všech zvířat v obou skupinách, výrazněji se však projevila u hypertenzivních potkanů SHR, kterým byl podáván sunitinib. Z hlediska

stereologické analýzy byla prokázána statisticky významně zvýšená exprese eNOS u potkanů, kterým byl po celou dobu podáván sunitinib, ve srovnání s kontrolní skupinou, které jsme podávali pouze vodu.

ZÁVĚR: Imunohistochemická a následná stereologická analýza prokázala signifikantní nárůst exprese eNOS pouze u spontánně hypertenzivních potkanů, kterým byl podáván sunitinib. Tato zvýšená exprese eNOS může souviset s rozvojem potenciálně protektivní reakce cévního endotelu na podávání sunitinibu. Lze tedy konstatovat, že sunitinib ovlivňuje cévní endotel, nicméně jeho potenciální vaskulární toxicita musí být ověřena testováním dalších markerů endoteliální dysfunkce.

KLÍČOVÁ SLOVA: sunitinib, arteriální hypertenze, cévní endotelová dysfunkce.

ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Depart of

Department of Biological and Medicinal Sciences

Candidate

Simona Loutocká

Consultant

PhDr. Zdeňka Kudáčková Ph.D.

Title of Thesis

Effect of Sunitinib on the expression of eNOS in normotensive and hypertensive rats

OBJECTIVE: We monitored the expression of eNOS in the aorta of spontaneously hypertensive rats (SHR) and normotensive rats (WKY) regarding the application of cytostatic sunitinib, i.e. whether the application of sunitinib results in vascular endothelial dysfunction.

INTRODUCTION: The application of sunitinib has considerable toxic effects on the human organism. In many cases it can deteriorate the disease itself, which leads either to reducing the doses of the applied medicine, or to interrupting treatment, the most frequent and most important adverse effect being arterial hypertension.

METHODS: While working on this thesis we compared two groups of animals: hypertensive SHR inbred males and normotensive WKY inbred males. Both these groups were further divided into two subgroups. While the first group of animals was given sunitinib from the start, the second group served as a control group and was given only water. The scheme of applying sunitinib to the SHR group of rats was as follows: 8 weeks of application, 5 weeks break, and then another 8 weeks of application. In case of the WKY rats, due to discovering symptoms of toxicity, the last stage of the scheme was shortened: 8 weeks of application, 5 weeks break, and 2 weeks of application. We used En Vision methods to detect eNOS expression. To assess the differences between the monitored groups we used stereological assessment.

RESULTS: Using imunohistochemical analysis, expression of eNOS was proven in both types of animals, but only in endothelium cells. eNOS expression was

detected in all the animals in both groups, however, it was more distinctively expressed in hypertensive SHR rats, which had been given sunitinib. Compared to the control group which had only been given water, stereological analysis has shown a statistically considerably increased expression of eNOS in rats which had been given sunitinib the whole time.

CONCLUSION: An imunohistochemical and a subsequent stereological analysis have proven a significant increase in eNOS expression only in spontaneously hypertensive rats which had been given sunitinib. This increased eNOS expression may be related to the development of a potentially protective reaction of vascular endothelium to the application of sunitinib. Thus we can say that sunitinib effects vascular endothelium, however, its potential vascular toxicity must be verified by testing other markers of endothelial dysfunction.

KEY WORDS: sunitinib, arterial hypertension, vascular endothelial dysfunction.

SEZNAM ZKRATEK

ACEI	inhibitory angiotenzin konvertujícího enzymu (<i>angiotensin-converting-enzyme inhibitor</i>)
ADH	antidiuretický hormon
AMTK	ambulantní měření krevního tlaku
AH	arteriální hypertenze
BB s ISA	betablokátory s vnitřní sympatomimetickou aktivitou
CaB	blokátory kalciového kanálu
DAB	diaminobenzidin
DM	diabetes mellitus
dTK	diastolický krevní tlak
EH	esenciální hypertenze
ESC	Evropská kardiologická společnost (<i>European Society of Cardiology</i>)
ESH	Evropská společnost pro hypertenzi (<i>European Society of Hypertension</i>)
GIST	gastrointestinální stromální tumor
IFN α	interferon alfa
IHC	imunohistochemie (<i>immunohistochemistry</i>)
IM	infarkt myokardu
ISH	Mezinárodní společnost pro hypertenzi (<i>International Society of Hypertension</i>)
KVR	kardiovaskulární riziko
KVS	kardiovaskulární systém
PBS	fosfátový pufr (<i>phosphate buffered saline</i>)
RAAS	renin-angiotenzin-aldosteronový systém
RCC	světlobuněčný renální karcinom (<i>renal cell carcinoma</i>)
SH	sekundární hypertenze (<i>secondary hypertension</i>)
SHR	spontánně hypertenzní potkani (<i>spontaneously hypertensive rat</i>)
sTK	systolický krevní tlak
TK	tlak krve
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor (<i>vascular endothelial growth factor</i>)
VEGFR	receptor pro VEGF
WHO	Světová zdravotnická organizace (<i>World Health Organization</i>)

WKY potkani Wistar Kyoto

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK.....	8
1. ÚVOD	12
2. CÍL A ZADÁNÍ PRÁCE	13
3. TEORETICKÁ ČÁST PRÁCE	14
3.1 ANATOMIE CÉV	14
3.1.1 Cévní systém	14
3.1.2 Obecná stavba krevních cév	14
3.1.2.1 Vrstvy cévní stěny	14
3.1.3 Specifická stavba krevních cév	16
3.1.3.1 Kapiláry	16
3.1.3.2 Rozdělení typů kapilár	17
3.1.3.3 Arterie	19
3.1.3.4 Vény	22
3.1.3.5 Lymfatické cévy	23
3.2 ARTERIÁLNÍ HYPERTENZE	25
3.2.1 Definice a klasifikace	25
3.2.2 Regulace krevního tlaku	26
3.2.2.1 Rychlé (krátkodobé) celkové regulační mechanismy	26
3.2.2.2 Pomalé (dlouhodobé) regulační mechanismy	28
3.2.3 Etiologie a patogeneze	28
3.2.3.1 Esenciální hypertenze	28
3.2.3.2 Sekundární hypertenze	29
3.2.4 Klasifikace hypertenze	33
3.2.5 Diagnostika hypertenze	35
3.2.5.1 Měření kauzálního krevního tlaku	35
3.2.5.2 Domácí měření krevního tlaku	36
3.2.5.3 Ambulantní monitorování krevního tlaku (AMTK)	36
3.2.6 Terapie hypertenze	37
3.2.6.1 Nefarmakologická terapie	37
3.2.6.2 Farmakologická terapie	37
3.2.7 Komplikace hypertenze	39
3.3 CYTOSTATIKA	41
3.3.1 Vývoj cytostatik	41
3.3.2 Základní principy cytostatické léčby	41
3.3.3 Cesty vedoucí k optimálnímu farmakoterapeutickému účinku za přijatelné toxicity vůči zdravé tkáni	42
3.3.4 Rezistence na cytostatickou terapii	44
3.3.5 Rozdělení cytostatik	44
3.3.5.1 Antimetabolity	44
3.3.5.2 Alkylační látky	45
3.3.5.3 Interkalační látky	45
3.3.5.4 Inhibitory topoisomeras	45
3.3.5.5 Inhibitory mitózy	45
3.3.6 Sunitinib	47
3.3.6.1 Chemické a fyzikální vlastnosti	47

3.3.6.2	Mechanismus účinku, farmakodynamika	48
3.3.6.3	Indikace sunitinibu	50
3.3.6.4	Nežádoucí účinky	52
3.3.6.5	Lékové interakce	53
3.3.7	Sunitinib a hypertenze	53
3.4	IMUNOHISTOCHEMIE	55
3.4.1	Základní charakteristika imunohistochemie	55
3.4.2	Klinický význam imunohistochemie	55
3.4.3	Historie imunohistochemie	55
3.4.4	Typy imunohistochemických metod	56
3.5	STEREOLOGIE	58
3.5.1	Vybrané stereologické metody	59
4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	61
4.1	MATERIÁL A METODY	61
4.1.1	Experimentální kmeny zvířat	61
	Pokusné skupiny zvířat	61
4.1.2	Pomůcky a přístroje	61
4.1.3	Farmaka, roztoky, činidla	62
4.1.4	Experimentální model	62
4.1.5	Metodika EN-VISION	63
4.2	POUŽITÉ PROGRAMY PRO STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ	64
4.3	VÝSLEDKY	65
4.3.1	Stereologická analýza exprese eNOS v aortě u hypertenzivních potkanů typu SHR	65
4.3.2	Stereologická analýza exprese eNOS v aortě u normotenzivních potkanů typu WKY	70
5.	DISKUZE	75
6.	ZÁVĚR	77
7.	POUŽITÁ LITERATURA	78

1. ÚVOD

Sunitinib patří do farmakologické skupiny cytostatik. Je to biologická látka, kterou řadíme do skupiny tyrozinkinázových inhibitorů používajících se nejčastěji v terapii metastatického renálního karcinomu a gastrointestinálních stromálních tumorů. Jeho dlouhodobější používání může mít však značné toxické účinky na lidský organismus projevujících se např.: průjmem, nauzeou, kožní vyrážkou, slizničními změnami a mnoha dalšími. Nejznámějším nežádoucím účinkem po podávání sunitinibu je arteriální hypertenze.

Tento nežádoucí účinek může vážně komplikovat terapii onemocnění a ve své prognóze ji zhoršovat. Může vyústit až v rozvoj ischemické choroby srdeční a následně akutního infarktu myokardu.

V této práci jsme se zaměřili na to, zda při podávání sunitinibu dochází ke vzniku cévní endotelové dysfunkce, tedy patologického stavu, který stojí na počátku rozvoje vážných onemocnění cévního systému jako je ateroskleróza, která se spolu s hypertenzí významně podílí na rozvoji výše uvedených patologií – ischemické choroby srdeční a akutního infarktu myokardu.

2. CÍL A ZADÁNÍ PRÁCE

Cílem práce bylo sledovat vliv sunitinibu na cévní endotel. Konkrétně na expresi eNOS u normotenzivních a hypertenzivních potkanů.

3. TEORETICKÁ ČÁST PRÁCE

3.1 ANATOMIE CÉV

3.1.1 Cévní systém

Cévní systém představuje uzavřený systém, kdy krevní cirkulace je poháněna srdeční činností. Tuto myšlenku přivedl na svět známý anglický lékař William Harvey již ve 20-tých letech 17. století. Myšlenky o tom, jak se krev uvnitř těla pohybuje, však spatřilo světlo světa už v dobách antického řeckého lékaře Galéna.

Hlavní úlohou oběhového systému je rozvod hormonů a výživných látek do buněk a tkání v celém těle. Cévy nepředstavují tuhé trubice, ale jsou to především dynamické struktury, které pulsují, stahují se a uvolňují a dokonce i prolifерují v závislosti na změnách nároků jednotlivých tkání. Mezi hlavní typy cév řadíme obecně tepny (arterioly), vlasečnice (kapiláry) a žíly (vény). V průběhu srdečního stahu je krev postupně vypuzována nejdříve do velkých cév, které vycházejí ze srdečních komor, dále pak do zužujících se tepenných větví až do nejmenších větví – tepének (arteriol), které následně ústí do vlasečnic. Po opuštění kapilárního řečiště je krev sváděna do žilek, které se postupně spojují a vytvářejí velké žíly, které nakonec ústí až přímo k hlavnímu cévnímu orgánu – srdce. Celková délka cévního systému, představující pod tímto pojmem jak malý, tak i velký krevní oběh, činí asi 100 000 km. (Junquero a kol., 1997; Marieb a kol., 2005)

3.1.2 Obecná stavba krevních cév

Stěna všech typů cév s výjimkou těch nejmenších se obvykle skládá ze tří základních vrstev. Jsou to vnitřní vrstva – *tunica intima*, střední vrstva – *tunica media* a zevní vrstva – *tunica externa* (někdy také adventicia). (Marieb a kol., 2005)

3.1.2.1 *Vrstvy cévní stěny*

Tunica intima – vnitřní povrch cév je sestaven z vrstvy endotelových buněk. Tyto buňky jsou zpravidla uloženy na bazální lamině a rychlost jejich výměny je odhadnuta na 1% na za den (Junquero a kol., 1997)

Těsně pod endotelem nacházíme tenkou tzv. subendoteliální vrstvu. (Marieb a kol., 2005)

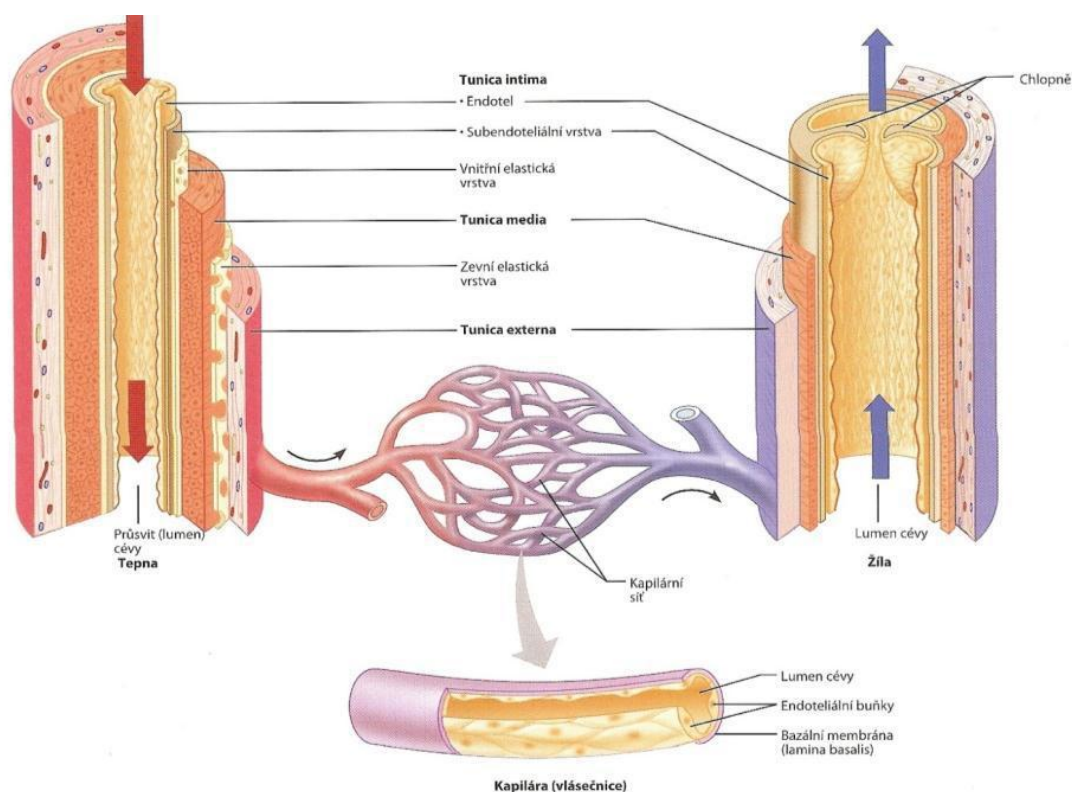
Vazivová vlákna i buňky hladké svaloviny, které jsou obsaženy v subendotelové vrstvě jsou podélně uspořádány. (Junquero a kol., 1997)

Tunica media – se skládá především ze šroubovitě vinutých koncentrických vrstev hladkých svalových buněk. Mezi těmito hladkými svalovými buňkami se nachází množství kolagenních a elastických vláken a také proteoglykanů.

V arteriích odděluje intimu od medie tzv. *lamina elastica interna*. Oproti tomu v tepnách se setkáváme s tenčí tzv. *lamina elastica externa*, která odděluje medii od adventicie.

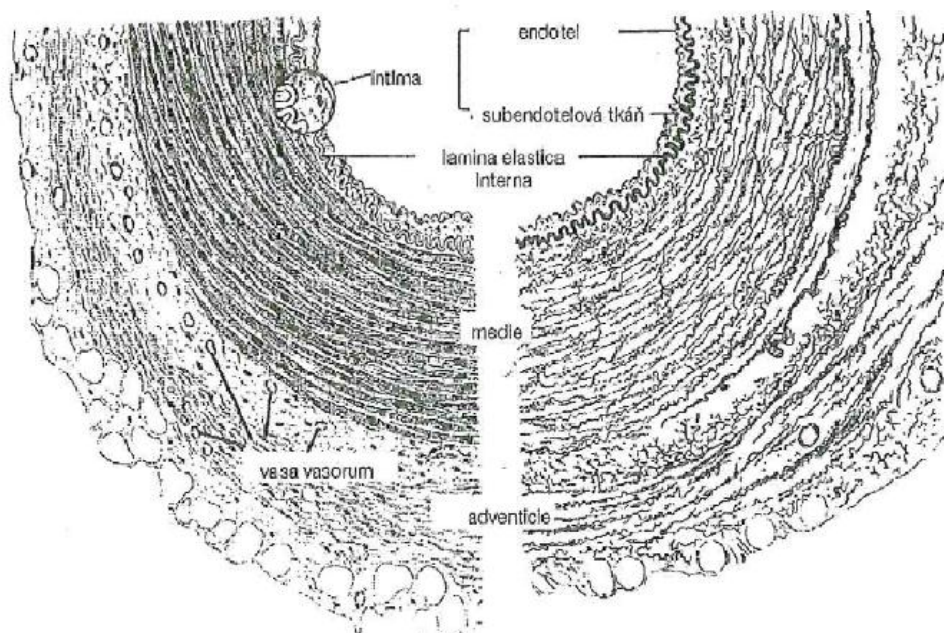
Tunica adventicie – je tvořena kolagenními a elastickými podélně uspořádanými vlákny. V adventicii se setkáváme především s kolagenem 1. typu, v medii s kolagenem 3. typu.

Obr. 1: Obecná stavba jednotlivých typů cév (Marieb, Mallatt, 2005)



Vasa vasorum – se nachází mezi vrstvou adventicie a medie. Někdy je tento název překládán jako „cévy cév“. Tyto cévy slouží k cévnímu zásobení velkých cév. Častěji se s nimi setkáváme ve venách než v arteriích, což je připisováno nižšímu obsahu kyslíku i živin ve venózní krvi. (Junquero a kol., 1997)

Obr. 2 Diagram porovnávající svalovou arterii barvenou hematoxylin a eosinem (vlevo) a Weigertovou metodou na elastiku (vpravo). (Junquero a kol., 1997)



3.1.3 Specifická stavba krevních cév

3.1.3.1 Kapiláry

Jsou nejmenší cévní kanály o průměru 7-9 μm . Stěna je tvořena vrstvou plochého jednovrstevného epitelu (endotelu). Některé kapiláry mají v endotelové výstelce fenestrace (póry). Délka kapilár se pohybuje mezi 0,25 až 1mm, zcela výjimečně však může dosahovat až 50mm. Celková délka kapilár v lidském těle byla odhadnuta na 96 000 km. Kapiláry patří mezi nejdůležitější cévy v těle, díky nim dochází k výměně látek v intersticiální tekutině (mezibuněčná tekutina) a zároveň k transportu živin a kyslíku do buněk a dusíkatých odpadních látek a oxidu uhličitého ven z buněk. (Douglas, 2004; Junquero a kol., 1997; Marieb a kol., 2005)

Objev kapilár

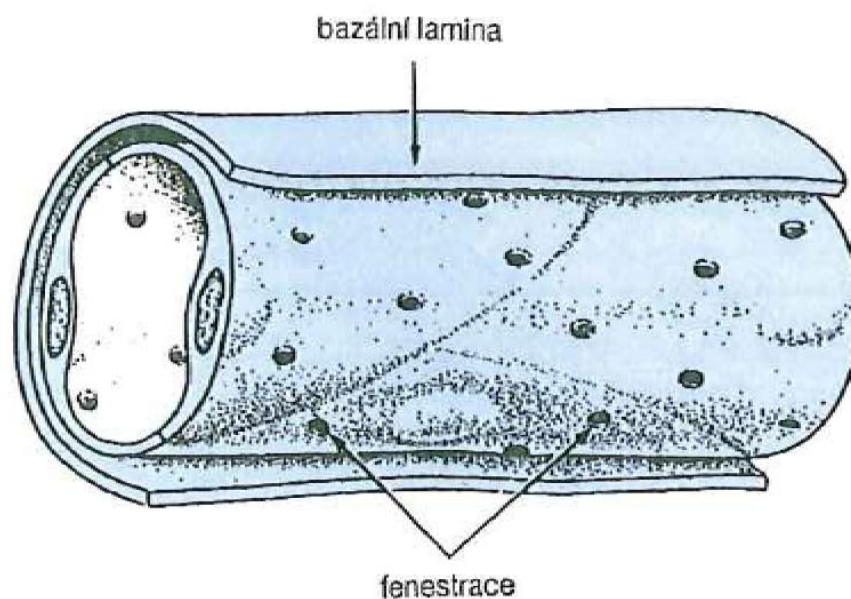
O objev kapilár, nebo-li vlásečnic se zasloužil italský lékař Marcello Malpighi (1628-1694), který ke zkoumání těla používal mikroskop. Působil jako profesor na univerzitě v Bologni a také jako osobní fyzik Inocence XII. Jako první vědec detailně popsal vlásečnice a jejich propojení k žilám a tepnám. Současně s tím

doplnil teorii dalšího známého vědce Wiliama Harveye o oběhové soustavě, když zjistil, že červené krvinky procházejí vlasečnicemi. V důsledku těchto objevů se jeho jméno často objevuje v několika anatomických názvech jako např.: Malpighiho vrstva v kůži. (Walker, 2003)

3.1.3.2 Rozdělení typů kapilár

- 1) **Souvislé čili somatické kapiláry** – jejich poznávacím znakem je nepřítomnost fenestrací v endotelu. Nejčastěji se vyskytují ve svalech, vazivu, exokrinních žlázách i v nervové tkáni.
- 2) **Fenestrované neboli viscerální kapiláry** – jsou opatřeny rozsáhlými fenestracemi ve stěně endotelových buněk. Fenestrace mají průměr 60-80nm a jsou uzavřeny přepážkou (diafragmou). S typem těchto kapilár se setkáváme nejčastěji v místech, kde dochází k rychlé výměně látek mezi krví a tkáněmi jako je např.: v ledvinách, ve střevech či endokrinních žlázách.
- 3) **Fenestrované kapiláry bez diafragmat** – v tomto případě nedochází k uzavírání otvorů v endotelové vrstvě. Endotelie jsou odděleny od přilehlých epitelových buněk (podocytů) velice silnou bazální laminou. Tento typ je charakteristický pro ledvinná tělíska. (Junquero a kol., 1997)

Obr. 3 Nákres struktury kapiláry opatřené fenestracemi (Junquiero a kol., 1997)

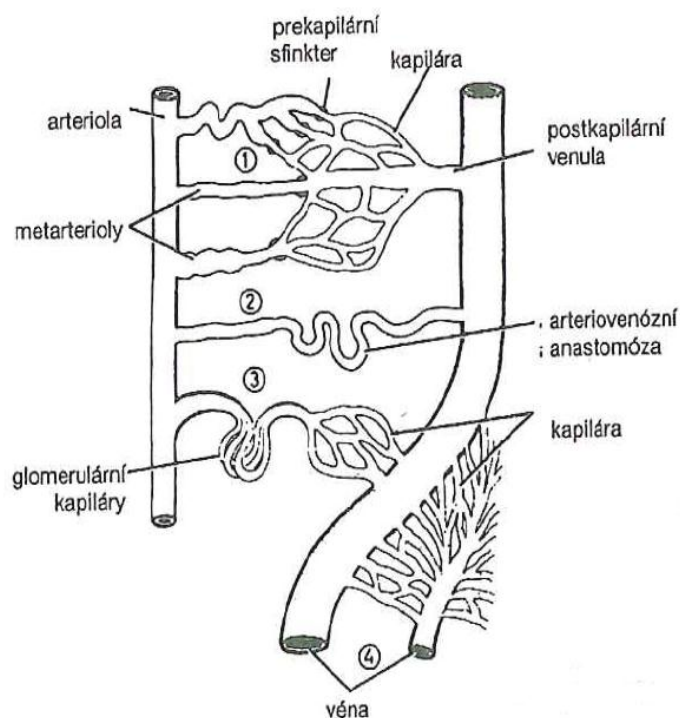


- 4) **Sinusoidy** – řadíme mezi atypické kapiláry. Jsou tvořeny systémem kanálů vložených mezi arteriolu a venulu (kostní dřeň) nebo mezi venuly (játra). Nejčastěji jsou zastoupeny ve žlázách s vnitřní sekrecí, mezi něž patří např.: nadledviny, hypofýza a další. (Klika, 1988).

Jak naznačuje **Obr. 2**, kapiláry spolu volně anastomozují a vytvářejí bohaté sítě, ty se dále větví na menší **metaarterioly**. V místě odstupu kapilár z metaarteriol dochází k vytvoření jednoduchého prstence, který slouží jako svěrač. Tento **prekapilární sfinkter** může průtok krve kapilárou úplně přerušit. S těmito arteriovenózními spojeními se nejčastěji setkáme v kosterním svalstvu a v kůži na rukou i nohou.

Hlavní úlohou kapilár je, že působí nejen jako zásobník krve, ale také jako syntetický a metabolický systém a zároveň jako selektivně prostupná bariéra. (Junquiero a kol., 1997)

Obr. 4 Typy mikrocirkulace v malých cévách (Junquero a kol., 1997)



3.1.3.3 Arterie

Arterie přivádějí krev do tkání. V počátečních úsecích odolávají rytmickým změnám krevního tlaku a v koncových úsecích regulují průtok krve. Podle velikostí dělíme arterie: arterioly svalové, arterie středního či velkého kalibru a velké arterie elastického typu. Arterie mají tlustší tunica media než vény. Arterie elastického typu obsahují ve své medii i adventicii více elastinu než ostatní cévy. Dalším jejich poznávacím znakem jsou světlolomné eozinofilní vrstvy membrána elastica interna a externa. Arterie na průřezu v porovnání s vénami jsou okrouhlejší, mají tlustší stěnu a menší lumen. (Junquero a kol., 1997; Paulsen, 2004)

Tabulka č. 1 Srovnání a klasifikace arterií (Paulsen, 2004)

Typ, funkce a příklady	Tunica intima	Tunica media	Tunica adventitia
Elastické, velké neboli vývodné arterie jsou arterie s největším průměrem v těle (např.: aorta). Odvádějí krev od srdce, jsou důležité pro udržení stálého tlaku v arteriálním systému. Při stahu levé komory (systola) je krev vypuzována do aorty pod vysokým hydrostatickým tlakem a vyvolává protažení arterií. Při ochabnutí komory (diastola) komorový tlak poklesne a elastické stěny velkých arterií se kontrahují. Převádějí tím sílu, která je dilatovala na hydrostatický tlak.	Je tlustší než u svalových arterií. Endotelové buňky ve všech cévách větších než kapiláry obsahují tyčinkovitá Weibelova-Paladeho granula , ve kterých se střeďují složky faktoru VIII. Endotel spočívá na bazální lamině, která leží na silné subendotelové vazivové tkáni. Mezi intimou a médií může být přítomna pórovitá membrána elastica interna, Je ale těžké ji rozpoznat vzhledem k velkému množství elastinu v médií.	Obsahuje velké množství elastinu v podobě koncentrických fenestrovaných blanek, jejich počet narůstá s věkem. Mezi elastickými blánami leží několik cirkulárně uspořádaných vrstev vláken hladké svaloviny. Svalové buňky jsou propleteny retikulárními vlákny (kolagen typu III) a zality do řídké základní hmoty obsahující chondroitinsulfát.	Je tenká vzhledem k průměru cévy. Obsahuje vlákna elastická i kolagenní (kolagen typu I) a membrána elastica externa, kterou lze těžko odlišit.
Svalové, střední neboli distribuční arterie mají různý průměr. Vyskytují se v mnoha tkáních a orgánech jako distribuční větve elastických arterií. Příkladem jsou arterie končetin (např.: arteria brachialis) a arterie břišní dutiny (např.: arteria mesenterica su-	Skládá se z typického endotelu a subendotelové vazivové tkáně. Nápadná membrána elastica interna se jeví jako zvlněná světlo- lomná linie mezi intimou a médií.	Je silná, skládá se až ze 40 vrstev hladké svaloviny. Podíl kolagenních a elastických vláken a proteoglykanů je různý (čím větší arterie, tím více elastinu v médií).	Je relativně tenká a obsahuje většinou kolagenní vlákna.

perior).			
Arterioly. Malé cévy arteriálního typu s průměrem 0,5 mm a metaarteriol v místě odstupu kapilár, mohou průtok krve kapilárami zcela zastavit	Skládá se z typického endotelu. Často není vytvořena vazivová subendotelová vazivová tkáň ani membrana elastica interna.	Skládá se z jedné až pěti vrstev hladké svaloviny, které obkružují lumen.	Je velmi tenká je složená z kolagenních vláken.
Metaarterioly jsou malé větve arteriol. Jejich stah může řídit průtok krve kapilárami. Prekapilární sfinktery , prstence hladké svaloviny kolem.	Skládá se z typického endotelu. Není vytvořena subendotelová vazivová tkáň ani membrana elastica interna.	Skládá se z jedné neúplné vrstvy hladké svaloviny.	Nelze ji odlišit.

Arterie procházejí neustálým vývojem v průběhu života od narození až do smrti. Každá z arterií má svou vlastní charakteristiku stárnutí. Arterie měnící se kolem 20. roku života nazýváme *koronární arterie*, ostatní se začínají měnit až po čtyřicítce. Při zeslabení medie tepny vrozeným defektem, chorobou nebo poraněním dojde k povolení její stěny a následné dilataci. Postupně vzniká *aneuryzma*, které může skončit až rupturou stěny.

Aterosklerotická ložiska jsou charakterizována místním ztluštěním intimy proliferací hladkých svalových buněk, zbytněním extracelulárních elementů vaziva a ukládáním cholesterolu v hladkém svalstvu a makrofázích. Tyto buňky, které jsou napěchovány lipidy nazýváme jako tzv. **pěnové buňky**. Lipidová depozita vytvářejí makroskopicky viditelné plaky a pruhy, které jsou charakteristické pro *aterosklerózu*. Nejvíce náchylné k ateroskleróze jsou koronární arterie. Některé z arterií zásobují jako konečné větve konkrétní oblasti specifických orgánů a jejich ucpání má za následek **nekrózu**. Tyto procesy nazýváme **infarkty**, se kterými se běžně setkáváme např.: v srdci, mozku, ledvinách a ostatních orgánech. (Junquero a kol., 1997)

Karotická tělíska

Malé útvary fungující jako receptory reagující na nízký parciální tlak, na nízké pH tepenné krve a zároveň na vysokou koncentraci oxidu uhličitého. Karotické tělísko se skládá ze dvou druhů buněk: glomových buněk (buněk I. typu) a obalových buněk (buněk II. typu). V glomových buňkách jsou skladovány látky typu dopaminu, norepinefrinu a serotoninu. Dodnes zatím není vyjasněno, zda vlastními chemoreceptory jsou glomové buňky, nebo aferentní nervová zakončení. (Junquero a kol., 1997)

Arteriovenózní anastomózy

Jsou přímé spojky mezi arteriemi a vénami řídící průtok krve pomocí kontrakcí hladké svaloviny. Obecně jsou roztroušeny po celém těle a spojují cévy menšího kalibru. Komplexní anastomózy zvané *glomys* se vyskytují nejčastěji v nehtových polštářcích, v lůžkách nehtů ale i v uších. Arterioly glomů nemají membrana elastica interna a obsahují více hladké svaloviny, která jim napomáhá se kontrahovat a úplně nebo částečně uzavřít cévy. Arteriovenózní anastomózy pomáhají regulovat krevní tlak, podílejí se na fyziologických procesech, jako je erekce či menstruace. Jejich hlavní funkcí je však distribuce krve při stresu, změnách teploty, či při těžké námaze. (Paulsen, 2004; Junquero a kol., 1997)

3.1.3.4 Vény

Odvádějí krev z vlásečnic do srdce. Jejich stavba se vyznačuje značnými místními rozdíly. Vény dolní poloviny těla jsou opatřeny chlopněmi, které zabraňují zpětnému průtoku krve. Tyto kapsovitě vychlípeniny jsou z obou stran pokryté endotelem. (Vacek, 1972)

Při uvažování o vénách jako o funkční jednotce můžeme jen říci, že se jedná o rezervoár, ve kterém se nachází až 70% celkového objemu krve. Podobně jako u arterií, i žíly můžeme rozdělit na venuly a vény malého, středního a velkého kalibru. (Junquero a kol. 1997)

Zvláštní úlohu mají vény s vysokým endotelem („high endothelial veins”-HEV), zde se díky receptorové výbavě endoteliální výstelky uskutečňuje prostup T-lymfocytů při recirkulaci a to zejména mezi thymem a periferními orgány. (Martínek, Vacek, 2009)

Tabulka č. 2 Srovnání a klasifikace vén (Paulsen, 2004)

Typ funkce a příklady	Tunica intima	Tunica media	Tunica adventitia
Velké vény s největším průměrem v těle (např.: <i>vena cava superior</i> a <i>vena cava inferior</i>) vedou krev směrem k srdci	Je dobře vyvinutá a obsahuje tlustou vrstvu subendotelové vazivové tkáně. Výběžky intimy vyčnívají do lumina velkých vén jako chlopně.	Obsahuje několik vrstev svalových buněk a četná retikulární a kolagenní vlákna, elastinu je zde málo	Je nejlépe vyvinutou vrstvou velkých vén. Obsahuje velké množství kolagenu a longitudinální svazky hladké svaloviny, které zesilují cévní stěnu a chrání ji proti nadměrnému roztahání.
Malé a střední vény jsou užší než velké vény, mají tenčí stěnu. Příklady jsou <i>vena portae</i> v břišní dutině) a <i>vena saphena</i> (na noze).	Obsahují typický endotel, méně subendotelové tkáně a méně chlopní než velké vény. Membrana elastica interna není vyvinuta.	Je tenká vzhledem k průměru cévy, obsahuje jen málo elastických vláken.	Je relativně tlustá, na rozdíl od velkých vén obsahuje hlavně kolagen, ale málo nebo žádnou svalovinu.
Venuly představují menší verze obecné struktury vén. Postkapilární venuly sbírají krev, která opouští kapiláry.	Obsahuje typický endotel, ale chlopně nejsou vyvinuty.	Je velmi tenká.	Je velmi tenká, obsahuje hlavně kolagen.

3.1.3.5 Lymfatické cévy

Kardiovaskulární systém se skládá nejen z krevního, ale i z lymfatického vaskulárního systému. Lymfatické cévy představují tenkostěnné kanály lemované endotelem. Uvnitř cév se nachází tkáňová tekutina **lymfa**, která je na rozdíl od krve distribuována pouze směrem k srdci nikoliv od něj. Lymfatické cévy rozdělujeme na **lymfatické kapiláry** a **větší lymfatické cévy**.

Lymfatické kapiláry – představují tenkostěnné vaky nebo slepě začínající trubice. Jsou zpravidla tvořeny jednou vrstvou endotelových buněk. V endotelu vystylajícím krevní kapiláry nenacházíme většinou ani fenestrace ani póry. Pod endotelovými buňkami téměř chybí **bazální lamina**. K okolní tkáni jsou

připojeny systémem **kotvících fibril**, které zabraňují uzavření lumina. Do lumina mohou vstupovat molekuly triglyceridů, proteinů a také buňky, zejména lymfocyty.

Větší lymfatické cévy – svou strukturou jsou podobné vénám. Jejich stěna je ale daleko tenčí a jen stěží lze rozpoznat jednotlivé hranice. (Konrádová, 2000)

3.2 ARTERIÁLNÍ HYPERTENZE

3.2.1 Definice a klasifikace

Podle kritérií WHO/ISH z r. 1999 a doporučení ESH/ESC z r. 2003 označujeme arteriální hypertenzi (AH) za opakované zvýšení krevního tlaku (TK) nad hranici 140/90 mm Hg, a to alespoň u dvou ze tří měření při minimálně dvou návštěvách u lékaře. (Vlček, Fialová a kol., 2010)

AH patří mezi nejčastější kardiovaskulární onemocnění s vysokou prevalencí v dospělé populaci (20-50%). Společně s diabetem, obezitou, dyslipidemií a kouřením je jedním z nejzávažnějších rizikových faktorů cévní mozkové příhody (CMP), ischemické choroby srdeční (ICHS) a ischemické choroby dolních končetin (ICHDK). Za AH považujeme opakované zvýšení TK $\geq 140/90$ mm Hg naměřené při dvou různých návštěvách. Při AH obvykle dochází ke zvýšení jak systolického (sTK), tak i diastolického tlaku (dTK) k tzv. systolicko-diastolické hypertenzi. U starších lidí se obvykle setkáváme pouze se zvýšeným sTK poté hovoříme o *izolované systolické hypertenzi*. (TK $\geq 160 \leq 90$ mmHg). (Češka a kol., 2010; Klener a kol., 2006)

AH je též někdy chápána jako symptom, který se stává nozologickou jednotkou („nemocí“) teprve na základě rozpoznání její etiologie a patogeneze. (Nečas, 2006)

Tabulka č. 3 Definice a klasifikace jednotlivých kategorií TK (v mm Hg), (Češka a kol., 2010)

Kategorie	Systolický tlak	Diastolický tlak
Optimální	< 120	< 80
Normální	120-129	80-84
Vysoký normální	130-139	85-89
Hypertenze 1. stupně (mírná)	140-159	90-99
Hypertenze 2. stupně (středně závažná)	160-179	100-109
Hypertenze 3. stupně (závažná)	≥180	≥110
Izolovaná systolická hypertenze	≥140	<90

3.2.2 Regulace krevního tlaku

Hlavním úkolem celkové regulace TK je řízení celkového periferního odporu a minutového srdečního výdeje tak, aby byl neustále udržován tlakový gradient, který je nezbytný pro udržení toku krve v cévách. Stručně řečeno regulační mechanismy zodpovídají především za udržení stálého arteriálního tlaku krve při různé redistribuci minutového srdečního výdeje. Regulačních systémů je v organismu velké množství. Celkové regulační mechanismy lze rozdělit podle doby, za kterou jsou schopny se uplatnit a to na mechanismy rychlé a pomalé odpovědi. Níže uvádím jejich podrobnější rozdělení. (Trojan a kol., 2003)

3.2.2.1 Rychlé (krátkodobé) celkové regulační mechanismy

Nervové regulační mechanismy – jsou zprostředkovány vegetativním nervovým systémem a to zejména sympatikem. Aktivaci sympatiku provází hypotenze, šokové stavy a terminální fáze městnavého srdečního selhání. Neuromuskulárním synaptickým mediátorem je zde noradrenalin, který vyvolává kontrakci hladkých svalů a vyvolává tak vazokonstrikční účinek. Baroreceptory kontrolují krevní tlak ve velkých arteriích, nejvíce jich je v oblouku aorty. Jedná se o tzv. mechanoreceptory, kterým po zvýšení TK, předávají patřičný signál po nervové dráze do centra v prodloužené míše, kde vyvolává útlum sympatiku a aktivaci parasympatiku, což má za následek pokles minutového srdečního výdeje

a celkového periferního odporu a tedy i normalizaci krevního tlaku. Při snížení TK dochází k opačnému efektu tzn. tlak se opět normalizuje. (Bureš, 2003)

Hormonální regulační mechanismy – nejdůležitější úlohu v tomto případě mají hormony dřeně nadledvin **adrenalin** a **noradrenalin**. Zatímco noradrenalin aktivuje jen alfa receptory a vyvolává tím vazokonstrikci, adrenalin působí na oba typy receptorů – alfa i beta. Zatímco v cévách, kde převažují alfa receptory vyvolává vazokonstrikci, tam kde působí beta receptory, vyvolává vazodilataci. Při zastoupení obou typů receptorů v cévách je rozhodující koncentrace adrenalinu. V praxi to znamená, že adrenalin v nízkých koncentracích vyvolá vazodilataci, ve vysokých vazokonstrikci. Kromě toho, že adrenalin vyvolává snížení celkového periferního odporu a redistribuci minutového objemu srdečního svým působením na beta receptory. Má i velký vliv na činnost myokardu a to na zvýšení minutového srdečního objemu. (Trojan a kol., 2003)

Z endotelu uvolňovaný endotelin také působí na cévní stěnu a to vazokonstrikčně. Při jeho intravenózní aplikaci dochází ke krátkodobému poklesu TK, který je následován déletrvajícím vzestupem TK. Působí také na srdce a to jak pozitivně inotropně, tak i pozitivně chronotropně. (Trojan a kol., 2003)

Systém **renin-angiotenzin-aldosteron** (RAAS) má vliv na mnoho složek v organismu a nelze ho tak přesně zařadit mezi rychlé nebo pomalé mechanismy. Jedná se o starý systém, brání ztrátám sodíku a vody z organismu. Za fyziologických okolností je aktivován pocením, zatímco za patologické situace ztrátou tekutin např.: průjmem. Při poklesu tlaku v ledvinách pod 90 mm Hg dochází ke zvýšení sekrece reninu. Tento hormon mající vlastnosti enzymu, dále štěpí angiotenzinogen za vzniku angiotenzinu I. Tento vzniklý dekaeptid je štěpen angiotenzinogen konvertujícím enzymem na angiotenzin II. Angiotenzin II působí v oblasti cév a vykazuje silný vazokonstrikční účinek a to především v oblasti arteriol. Kromě toho aktivuje sympatikus a stimuluje sekreci aldosteronu. Mimo uvedených rychlých účinků jsou zaznamenány i účinky pomalé – zvýšená sekrece antidiuretického hormonu (ADH) v hypotalamu, pocit žízně a podpora chuti na slané, stimulace syntézy aldosteronu v kůře nadledvin, podpora resorpce Na^+ v proximálním tubulu ledvin. Hlavním úkolem aldosteronu je řídit transport Na^+ a K^+

v ledvinách a dalších orgánech. Také zvyšuje citlivost hladkých svalových buněk k angiotenzinu II. (Bureš, 2003; Trojan a kol., 2003; Berger, 1996).

3.2.2.2 Pomalé (dlouhodobé) regulační mechanismy

Jejich hlavním úkolem je řízení celkového objemu krve a tím i regulace TK. ADH ve vyšších dávkách působí vazokonstrikčně, jeho hlavním účinkem je však zpětná resopce vody v distálním a sběrném ledvinném tubulu. Aldosteron zvyšuje objem krve v cirkulaci, současně zvyšuje žilní návrat, což vede ke zvýšení minutového srdečního výdeje. Jeho účinek však nastupuje až po několika hodinách a plně se projeví po několika dnech. (Trojan a kol., 2003)

3.2.3 Etiologie a patogeneze

Z hlediska etiologie rozdělujeme AH na:

- 1) **primární arteriální hypertenzi** neboli **esenciální** – kdy neznáme organickou příčinu vzestupu TK,
- 2) **sekundární** neboli **symptomatickou hypertenzi** – při níž TK je symptomem jiného onemocnění.

Esenciální hypertenze představuje asi 90% hypertenzní populace, naopak sekundární hypertenze jen asi 10%. Odlišení primární hypertenze od sekundární je důležité pro možnosti specifické léčby, která může vést u odstranitelných příčin (feochromocytom, renovaskulární hypertenze, primární hyperaldosteronismus, koarktace aorty a další) v časných stádiích k vymizení hypertenze. Na sekundární hypertenzi pomýšlíme v důsledku náhlého zhoršení TK nebo při závažném začátku hypertenze. (Klener a kol., 2006; Češka a kol., 2010)

3.2.3.1 Esenciální hypertenze

U esenciální hypertenze neznáme příčinu vzniku, naproti tomu však známe celou řadu patogenetických mechanismů, které se na jejím vzniku významně podílejí. Zde zařadíme nejen *genetický podíl*, který hraje svou významnou roli, ale především *faktory zevního prostředí*. Mezi tyto faktory řadíme např.: špatnou životosprávu, nadměrný přívod potravin, nadměrnou konzumaci alkoholu, kouření, obezitu, stresové situace, nedostatečný přísun minerálů – draslíku, vápníku, magnézia a mnoho dalších. Z *endogenních vlivů* se vedle centrálního a sympatoadrenálního nervového systému podílí na patogenezi řada humorálních

působků, které z hlediska patofyziologie působí buď vazokonstrikčně, nebo vazodilatačně. Mezi další endogenní změny se řadí odchylky v elektrolytových transportních mechanismech přes buněčnou membránu. (Klener a kol., 2006)

3.2.3.2 Sekundární hypertenze

Tento typ hypertenze bývá vyvoláván orgánovými změnami. Postihuje jen asi 2-5% celkové populace. Správné rozpoznání sekundární hypertenze spočívá v nutnosti specifické terapie a u řady z nich i v chirurgickém odstranění příčiny a jejím následném vyléčení. (Klener a kol., 2006)

- 1) **Renální hypertenze** – je považována za následek některého z renálních onemocnění. Velmi často se jedná o nemoci ledvinného parenchymu tj. např.: akutní a chronické záněty, cystické, metabolické a toxické poškození ledvin, nádory a úrazy. Mezi další příčiny můžeme řadit obstrukci močových cest. Z hlediska patogeneze se jedná o zvýšení objemu extracelulární tekutiny a stimulaci RAAS. Na rozdíl od esenciální hypertenze se vyznačuje rychlejším nástupem a nápadnějším nálezem v moči (proteinurie). (Vlček, Fialová a kol., 2010)
- 2) **Renovaskulární hypertenze** – je způsobena stenózou ledvinné tepny. Na tento typ hypertenze myslíme nejčastěji při náhlém zhoršení hypertenze, jejím náhlém vzniku či u těžko léčebně ovlivnitelné hypertenze. V patogenezi se u tohoto typu hypertenze často účastní RAAS. Fyzikální vyšetření nám zpravidla pomáhá odhalit systolicko-diastolický šelest v levém či pravém mezogastriu. Existují celé řady vyšetření jako např.: vylučovací urografie, izotopová nefrografie, odběr krve z obou ledvinných žil, které nám napomáhají dané onemocnění poodhalit. Klíčovým vyšetřením však v tomto případě je angiografie, která nám poodhalí případnou stenózu a zároveň nám poskytne informaci o jejím typu. Léčba je chirurgická a interní. Chirurgický typ léčby volíme nejčastěji v důsledku neúspěchu interní léčby. V tomto případě mluvíme o tzv. transluminální angioplastice stenozované tepny. Prognóza je zpravidla lepší u nemocných, u nichž je stenóza na podkladě fibromuskulární dysplazie cévní stěny. (Kordač, 1988)
- 3) **Endokrinní hypertenze** – do této skupiny řadíme hyperfunkční onemocnění některých endokrinních žláz, které vedou k nadprodukci vazopresorických

substancí. Velmi časté jsou v tomto případě různé typy hyperfunkcí, ať už mluvíme o adrenokortikální hyperfunkci – **Cushingův syndrom** při nadprodukci kortizolu, nebo sympatoadrenální hyperfunkci – **feochromocytom** při nadprodukci katecholaminů. Můžeme sem zařadit i primární hyperaldosteronismus, nebo-li **Connův syndrom**. Hypertenzi nacházíme při poruše štítné žlázy (hypotyreóza i hypertyreóza), nebo při nadprodukci růstového hormonu. Celkový počet těchto endokrinních hypertenzí nepřevyšuje počet 1-2% celkové populace hypertoniků. Klinické i laboratorní příznaky jsou charakteristické. (Klener a kol., 2006; Vlček, Fialová a kol., 2010; Widimský a kol., 2006)

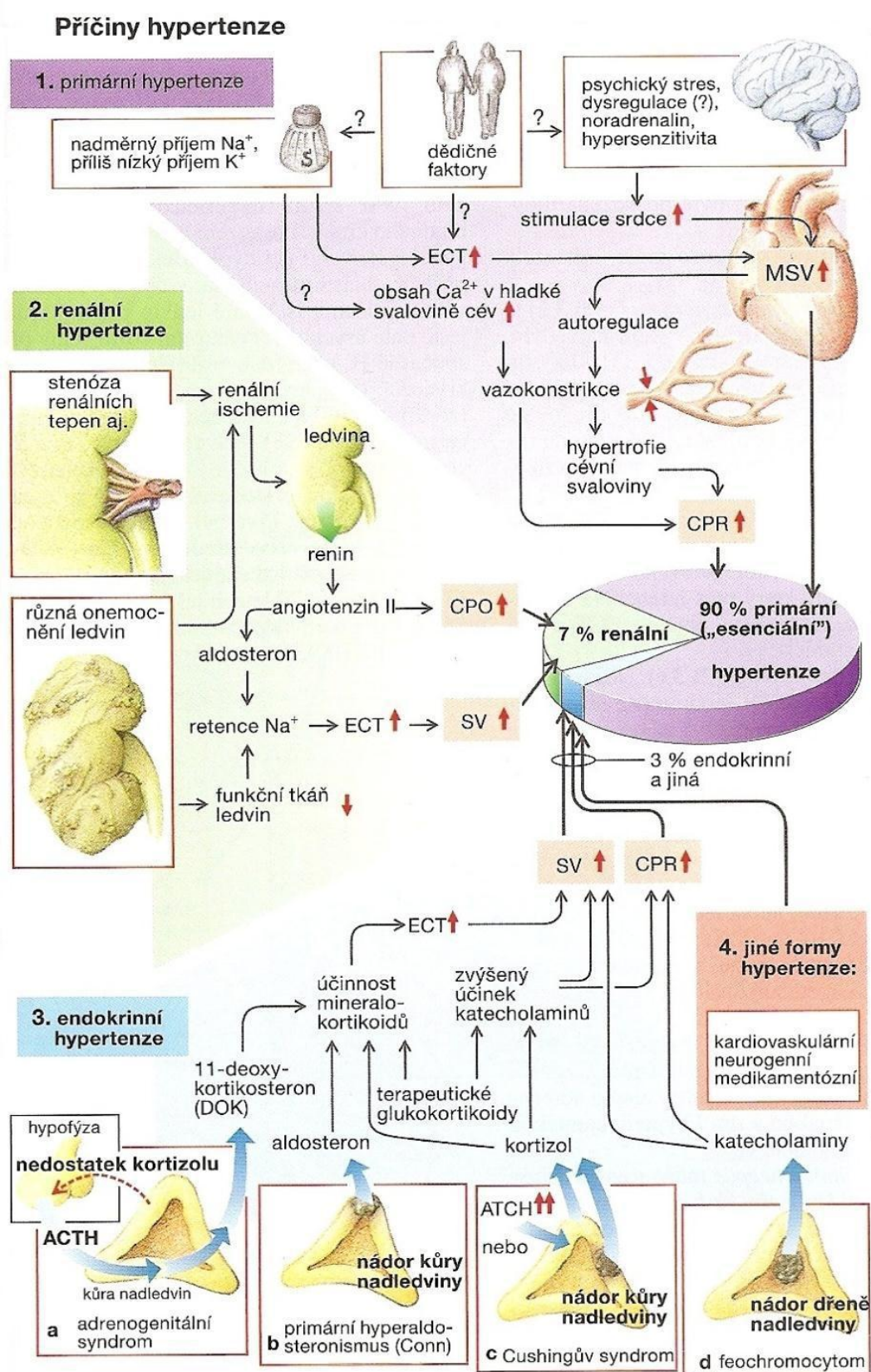
- 4) **Hypertenze vyvolané podáváním léků** – s tímto typem hypertenze se nejčastěji setkáváme po podávání vyšších dávek glukokortikoidů, nebo steroidních kontraceptiv s vyššími hladinami estrogenů. V dnešní době jsou léčiva typu steroidních kontraceptiv natolik šetrná, že výše uvedené riziko u nich takřka nepřipadá v úvahu. Vnímavé jsou především ženy s pozitivní rodinnou anamnézou, s hypertenzí v těhotenství nebo s obezitou. Hypertenze může vzniknout i po některých výtažcích z *lékořice* a léčích obsahujících *karbenoxol sodný*. Rovněž některá *nesteroidní antiflogistika* mohou podporovat její vzestup. (Klener a kol., 2006)
- 5) **Hypertenze v těhotenství** – je hlavní příčinou mateřské, fetální i novorozenecké morbidity a mortality v civilizovaných zemích. Podstatné v tomto případě je rozlišení, zda hypertenze předchází těhotenství (preexistující hypertenze), nebo zda jde o stav specifický (gestační hypertenze). Nefarmakologická léčba je podstatná u těhotných žen, kde jsou přesáhnuty hodnoty sTK 140-150 mm Hg nebo dTK 90-99 mm Hg. Na rozdíl od ostatních není doporučována restrikce soli ani redukce hmotnosti. Prahovou hodnotou pro zahájení antihypertenzní léčby jsou hodnoty sTK 140 mm Hg a dTK 90 mm Hg u žen s gestační hypertenzí bez proteinurie a preexistující hypertenzí před 28. týdnem těhotenství. V případě, že se nejedná o závažnou hypertenzi, lze za léky volby považovat: labetalol, methyldopu, blokátory kalciových kanálů a β -blokátory. Léčba ACEI a sartany je v průběhu těhotenství kontraindikována. Léčba diuretiky

je v tomto případě neopodstatněná pokud se nejedná o přítomnost oligourie. (Cífková, 2007)

6) Mezi další příčiny vzniku sekundární hypertenze řadíme hypertenzi vzniklou na základě:

- a) **kardiovaskulárních příčin** – koarktace aorty je zpravidla provázena hypertenzí v horní polovině těla, při níž dochází k zúžení aorty v oblasti jejího oblouku. Nacházíme zde velkou tlakovou diferenciaci mezi TK na horních a dolních končetinách. Na hrudníku bývá patrná uzurace žeber s rozšířenými mezižeberními artériemi. Terapie je zpravidla chirurgická, pokud možno v dětském věku.
- b) **neurologických příčin** – významnou roli zde hrají psychogenní vlivy – při zvýšení intrakraniálního tlaku, při spánkové apnoei či u akutního stresu. (Češka a kol., 2010; Mačák, Mačáková, 2004)

Obr. 5 Schématické znázornění příčin hypertenze (Silbernagl, Lang, 2001)



3.2.4 Klasifikace hypertenze

Z hlediska závažnosti a orgánových změn dělíme hypertenzi do tří, respektive čtyř stádií.

Tabulka č. 4 Klasifikace AH podle WHO na základě vývojových stádií (Vlček, Fialová a kol., 2010)

Stadium	Popis
I	Prosté zvýšení TK bez orgánových změn.
II	Zvýšení TK doprovázené orgánovými změnami (hypertrofie LK, proteinurie, kalcifikace aorty aj.), není porušena funkce.
III	Zvýšení TK s přítomností orgánových změn, velmi často doprovázené poruchou funkce (renální insuficience, srdeční selhávání, poruchy zraku a další).
IV	Maligní hypertenze, nárůst TK s progresivním mnohočetným orgánovým selháváním.

Vysoký TK zatěžuje a poškozuje nejen tepny, ale zároveň i srdce. V důsledku toho se jeho komora musí adaptovat na tlakové přetížení. V tomto případě mluvíme o *hypertenzním srdci – cor hypertonicum*. Při hypertrofii levé komory samotná tloušťka dosahuje až 20mm a hmotnost srdce bývá i 600g. Dobře kompenzovaná hypertenze může být léta asymptomatická a projeví se až při vzniku např.: dekompenzace srdce nebo fibrilaci síní. Z hlediska histologie je obraz *cor hypertonicum* zcela necharakteristický. Při pitvě bez další znalosti klinických dat o pacientovi nelze rozlišit dekompenzované hypertenzní srdce od dilatovaného typu kardiomyopatie. (Povýšil, Šteiner a kol., 2007)

Kromě toho je vysoký krevní tlak rizikovým faktorem pro vznik aterosklerózy i s jejími následky jako jsou např.: IM, iktus, poškození ledvin aj. Velmi výrazně tím zkracuje délku života u značné části lidské populace. (Silbernagl, Despopoulus, 2004)

Následky hypertenze lze rozdělit na hypertenzní a aterosklerotické:

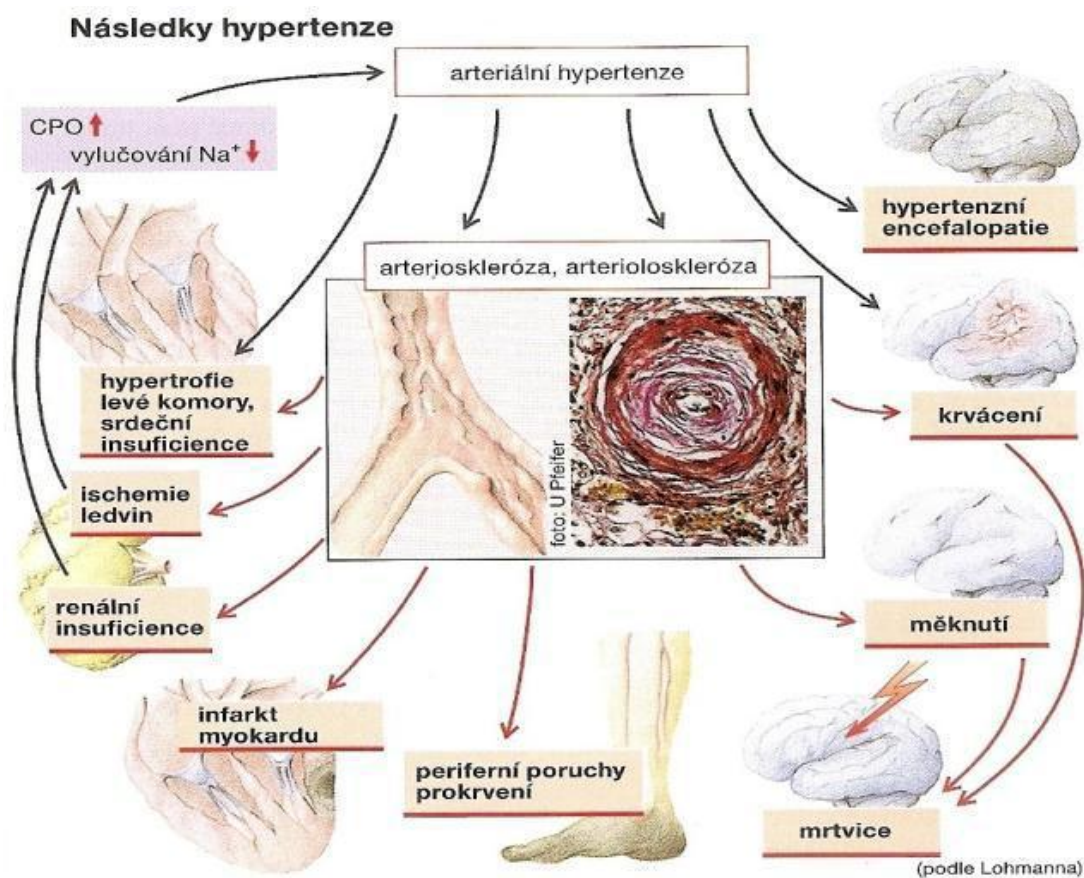
1) **Hypertenzní:**

- a) hypertrofie levé komory
- b) srdeční insuficience
- c) nitromozkové nebo subarachnoidální krvácení
- d) ledvinné selhání
- e) hypertenzní retinopatie
- f) maligní hypertenze
- g) hypertenzní krize nebo encefalopatie
- h) disekující aneuryzma

2) **Aterosklerotické**

- a) ICHS (angina pectoris, infarkt myokardu, náhlá smrt)
- b) aterotrombotické mozkové příhody
- c) aneuryzma aorty
- d) onemocnění periferních tepen
- e) stenóza renální arterie (Widimský, 1993)

Obr. 6 Schématické znázornění následků hypertenze (Silbernagl, Lang, 2001)



3.2.5 Diagnostika hypertenze

3.2.5.1 Měření kauzálního krevního tlaku

Tlak krve se rutinně měří metodou Riva-Rocii, která využívá nafukovací manžetu pevně obtočenou kolem paže. Po jejím řádném upevnění se napumpuje tonometrem z hodnoty cca 30 mm Hg na úroveň vyšší, než je předpokládaný tlak (vymizení pulzací). Technice měření je nutno věnovat velkou pozornost. Měření krevního tlaku se zpravidla provádí v ordinaci po 10-ti minutovém zklidnění pacienta. Pacient zpravidla sedí s volně položeným předloktím ve výši srdce a pevně upevněnou manžetou asi 5cm nad loketní jamku. Jako zlatý standart se dodnes používá rtuťový tonometr s přiměřeně širokou manžetou (tu zvolíme zpravidla podle obvodu paže). (Silbernagl, Lang, 2001; Česka a kol., 2010)

Krevní tlak měříme s přesností na 2mm Hg. U těhotných žen, dospělých i dětí dTK odečítáme až po vymizení ozev (V. fáze Korotkových fenoménů). Někdy jsou Korotkovy fenomény slyšitelné až k 0 mm Hg tzv. fenomén nekonečného tónu. Při této situaci postupujeme následovně a to tak, že odečteme dTK jako u IV. fáze Korotkových fenoménů. U hypertoniků může být přítomna auskultační mezera.

Měření TK vestoje je velmi důležité u diabetiků, starších osob s hypertenzí, kde je vyšší riziko vzniku ortostatické hypotenze. Měření vestoje se provádí zpravidla po 1 resp. 5-ti minutách vzpřímené polohy, kdy manžeta s tonometrem by měla být v úrovni srdce a paže opřená jako při poloze vsedě. Měření TK pomocí aneroidního manometru je méně přesné a vyžaduje oproti rtuťovému tonometru opakovanou kalibraci přístroje. (Češka a kol., 2010)

3.2.5.2. Domácí měření krevního tlaku

Vedle měření TK v ordinacích lékařů je pro lepší informovanost pacienta měření TK v domácích podmínkách, u kterých zpravidla postupujeme stejně jako u lékaře. K dispozici však obvykle máme digitální tonometr, který nám zaznamenává obvykle tři hodnoty: sTK, dTK a hodnotu pulzu. Hodnoty TK v domácích podmínkách $\geq 135/85$ jsou považovány za zvýšené. (Češka a kol., 2010)

3.2.5.3. Ambulantní monitorování krevního tlaku (AMTK)

24hodinové ambulantní měření nám poskytuje více údajů o sledovaném jedinci než měření domácí či ambulantní. Tyto údaje lépe poodhalují pacienty s cílovým poškozením orgánů u hypertenze a s celkovým kardiovaskulárním rizikem (KVR). Umožňuje nám měření TK po zvolenou dobu (24-48 hodin). K dispozici máme počítačově zpracované údaje – průměrné denní, noční a 24hodinové hodnoty systolického, diastolického, středního a pulzního tlaku. AMTK nám zachycuje variabilitu kolísání hodnot TK. Pomáhá současně diagnostikovat nemocného trpícího syndromem bílého pláště nebo maskovanou hypertenzi. Umožňuje nám také sledovat 24 hodinový efekt podávaných léčiv. (Řiháček a kol., 2008)

Tabulka č. 5 Normální hodnoty kauzálního TK a AMTK (Řiháček a kol., 2008)

Druh měření TK	Normální hodnoty TK (mm Hg)
Kauzální TK	< 140/90
AMTK 24hodinový průměr	< 130/80
AMTK den (6-22 hodin)	< 135/85
AMTK noc (22-6 hodin)	< 120/70

3.2.6 Terapie hypertenze

Příznivý vliv antihypertenzní terapie, jak na koronární, tak na cerebrovaskulární mortalitu byl prokázán u pokročilých forem hypertenze, ale i u mírné hypertenze. V důsledku tohoto zjištění musíme léčit všechny hypertoniky. V léčbě využíváme jak nefarmakologické, tak i farmakologické terapie. (Klener a kol., 2006; Češka a kol., 2010)

3.2.6.1 Nefarmakologická terapie

Je základem léčby u všech nemocných s hypertenzí. Ve většině případů bývá však doprovázena i farmakologickou léčbou.

Nefarmakologická léčba hypertenze:

- zanechání kouření,
- snížení konzumace alkoholu (u mužů do 30g/den, ženy do 20g/den),
- omezení příjmu soli do 5-6g/den,
- dostatečné množství tělesné aktivity (30-45 min., 3-4x týdně),
- zvýšená konzumace zeleniny a ovoce, snížený příjem tuků zejména nenasycených,
- omezení léků podporujících retenci sodíku a vody v lidském organismu, např.: NSAID, sympatomimetika, kortikoidy, u citlivých žen steroidní antikoncepce a některé drogy. (Češka a kol., 2010)

3.2.6.2 Farmakologická terapie

Farmakologickou léčbu u hypertoniků bez vstupního vyššího kardiovaskulárního rizika (hypertrofie levé komory srdeční, DM) zpravidla

zahajujeme až v okamžiku, kdy nedošlo ke zlepšení zdravotního stavu po striktním dodržování režimových opatření (viz. Nefarmakologická terapie) tj. po 2-3 měsících. Naopak u hypertoniků s vyšším kardiovaskulárním rizikem a u pacientů s hodnotami $sTK \geq 180/100$ či $dTK > 110$ zahajujeme farmakologickou léčbu ihned. Léčba AH není symptomatická (AH nebolí ani nás nijak v počátečních stádiích neomezuje), prokazatelně však zlepšuje vyhlídky pacienta do budoucna. (Vlček, Fialová a kol., 2010)

V současné době doporučené postupy doporučují stupňovitou léčbu AH, jejíž základ tvoří 5 skupin léčiv: diuretika, betablokátory (BB), ACEI, blokátory AT1 receptorů (sartany) a CaB. V poslední době přibylo důkazů, že moderní antihypertenziva (ACEI, CaB) jsou vhodnější pro terapii ve srovnání s diuretiky a betablokátory, a to jak z hlediska kardiovaskulárního, tak i metabolického a renálního rizika. Druhou skupinu antihypertenziv tvoří léky užívané pro kombinační terapii: centrálně působící antihypertenziva, alfablokátory a antihypertenziva s přímým vazodilatačním účinkem. Na počátku léčby obvykle volíme monoterapii, při nedostatečném klinickém výsledku pokračujeme s kombinační léčbou. U těžších forem hypertenze nebo u hypertoniků s vysokou hodnotou $dTK \geq 115$ mm Hg zahajujeme léčbu přímo dvojkombinací antihypertenziv. Při výběru terapie k pacientovi přistupujeme zcela individuálně. V tomto případě není dobré postupovat podle „algoritmů“. (Rosolová, 2011; Vlček, Fialová a kol., 2010)

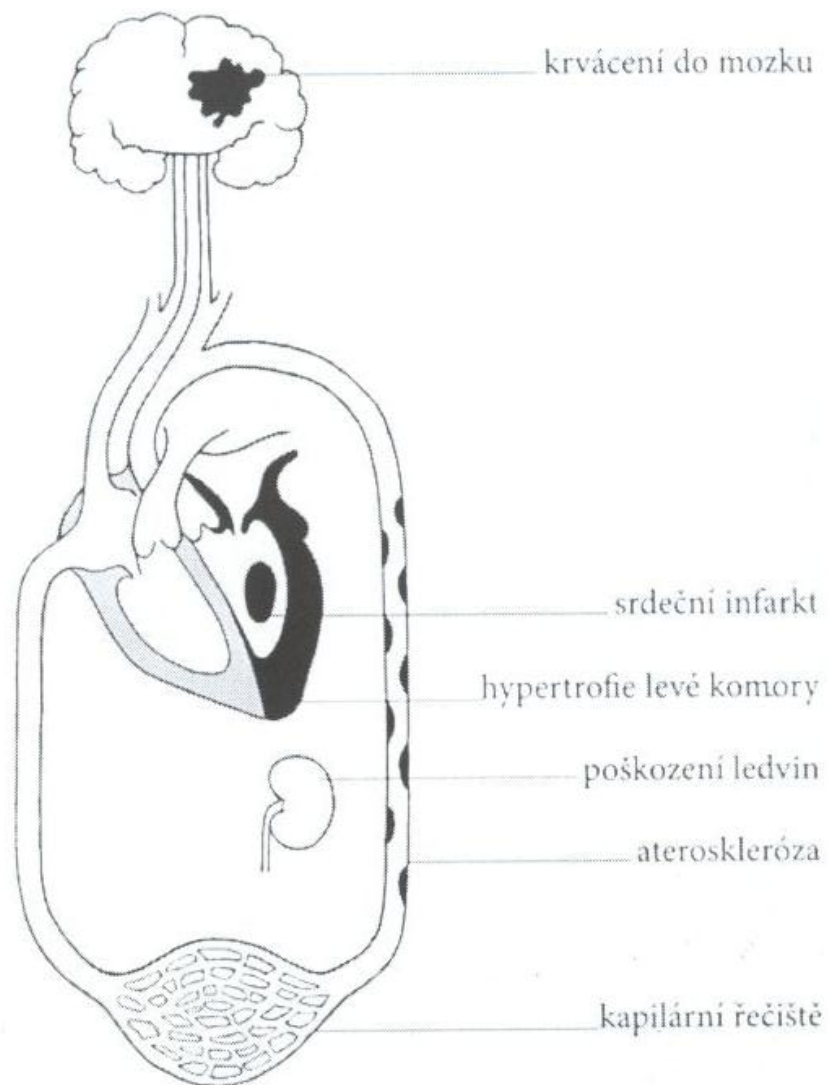
Tabulka č. 6 Přehled indikací hlavních antihypertenziv při orgánových komplikacích hypertenze a v přítomnosti dalších doprovodných onemocnění (Vlček, Fialová a kol., 2010)

Doprovodné onemocnění	Vhodná antihypertenziva
Hypertrofie LK	ACEI, sartany, CaB, BB, diuretika jsou méně vhodná výjimkou je indapamid
ICHS	BB
Srdeční selhání	ACEI, sartany, BB, diuretika
Diabetes mellitus	ACEI, sartany, CaB, α -adrenergní látky, kardioselektivní látky
Hyperlipoproteinémie	ACEI, sartany, CaB, α -adrenergní látky, BB s ISA
Stařecká hypertenze	Diuretika, ACEI, sartany, CaB
Onemocnění ledvin	ACEI, sartany, CaB

3.2.7 Komplikace hypertenze

- 1) Krvácení do mozku
- 2) Srdeční zbytnění
- 3) Ischemie srdečního svalu
- 4) Selhání levé komory
- 5) Poškození ledvin
- 6) Urychlení aterosklerózy tepen

Obr. 7 Komplikace vysokého krevního tlaku (Mačák, Mačáková, 2004)



3.3 CYTOSTATIKA

Tato farmaka se často označují též jako **chemoterapeutika** nebo **antineoplastika**. Z hlediska vývoje bylo jejich hodnocení zahájeno již po 2. světové válce. Od té doby až dodnes bylo identifikováno co do účinku a toxicity na 50 léčiv různých farmakologických skupin. Jejich chemická struktura zahrnuje pestrou skupinu látek, které různým mechanismem zpomalují nebo zastavují růst a množení nádorových buněk. Ideální protinádorová látka by měla zcela zničit nádorové buňky, aniž by přitom došlo k poškození normální buňky. Žádné z používaných cytostatik tyto vlastnosti bohužel nemá. (Hartl, Doležel, Miletín a kol., 2006; Lincová, Farghali a kol., 2007)

3.3.1 Vývoj cytostatik

Vývoj cytostatik spadá do 40.-tých let minulého století. Prvními významnějšími cytostatiky se staly **dušikaté yperity**. Objasnění alkylačního mechanismu jejich účinku vedlo k objevu řady dalších **alkylancí** např.: derivátů aziridinu, esterů kyseliny methansulfonové aj.

K dalšímu pokroku došlo při vysvětlení biochemických pochodů a poznání určitých látek pro buněčný metabolismus. Vznikla nová skupina látek nazývaná dodnes jako **antimetabolity**. Sem řadíme vedle antagonistů kyseliny listové, též analoga purinových a pyrimidinových bází.

Z počátku byla chemoterapie vnímána spíše jako doplňkový způsob léčby. K obratu došlo kolem 60. let minulého století, kdy se chemoterapeutická léčba postupně stala rovnocennou léčebnou metodou chirurgickému zákroku i ozařování. Z chemického hlediska zahrnují cytostatika velmi početnou skupinu látek jak přírodního charakteru, tak i látky syntetické. (Hartl, Doležel, Miletín a kol., 2006)

3.3.2 Základní principy cytostatické léčby

Cílem cytostatické léčby je zajistit optimální farmakoterapeutický účinek za přijatelné toxicity vůči zdravé tkáni. Současně je nutno zajistit prevenci sekundární rezistence. K dosažení tohoto cíle vede zvyšování dávek (eskalace), kombinace cytostatik, kombinace cytostatik s jiným druhem terapie (chirurgická terapie, ozařování), podpůrná terapie nebo využití antagonistů, biochemická

modulace účinku, zajistit optimální cestu podávání cytostatik a využití cirkadiálních rytmů. V praxi hodnotíme cytostatický účinek pomocí dvou základních kritérií – podle frekvence odpovědi na léčbu a podle doby přežití. (Lincová, Farghali a kol., 2007)

Současně závisí cytostatický účinek na selektivitě, s jakou dané léčivo ovlivňuje buněčný cyklus. Cytostatika působící na množící se buňky v proliferativní fázi mají buď fázově specifický či nespecifický účinek. (Lincová, Farghali a kol., 2007)

Fázově nespecifický účinek – postihuje buněčný cyklus ve všech fázích. Současně se zvýšením dávky roste rychlost zabíjení maligních buněk. Tuto vlastnost mají: antibiotika, alkylující látky, cisplatina a deriváty nitrosourey.

Fázově specifický účinek – postihuje pouze specifické fáze cyklu. Se stoupající dávkou se rychlost zabíjení zvyšuje nejprve exponenciálně, ve vyšších dávkách dosahuje však jen určitého maxima. Tímto způsobem se chovají: antimetabolity, rostlinné alkaloidy a z antibiotik např.: bleomycin. (Lincová, Farghali a kol., 2007)

3.3.3 Cesty vedoucí k optimálnímu farmakoterapeutickému účinku za přijatelné toxicity vůči zdravé tkáni

- 1) **Zvyšování dávek** – vysokodávková terapie (high-dose therapy-HDT) bere v úvahu nejen velikost jednotlivé dávky, ale také rychlost přívodu léčiva za jednotku času a demografické údaje o nemocném. Zpravidla se vztahuje k tělesnému povrchu a udává se tak v jednotkách mg/m^2 za den (týden). Jejich využití je největší u malignit s horší prognózou a vyšším počtem rizikových faktorů.
- 2) **Kombinovaná chemoterapie** – výběr cytostatik v tomto případě není náhodný. Dříve se v léčbě rakoviny podával pouze jeden druh léku, dnešní doba však poukazuje na použití dvou či více protinádorových léčiv a dosažení tak lepšího výsledného léčebného účinku. Abychom dosáhli synergismu za nezvýšené toxicity, použijeme buď fázově nespecifického, či fázově specifického podání cytostatik.
- 3) **Chirurgická léčba a ozařování (radioterapie)** – podle vztahu chemoterapie k chirurgické léčbě rozlišujeme dva pojmy: *adjuvantní chemoterapie*

je definovaná jako cytostatická chemoterapie po radikální resekci, jejímž cílem je eradikace všech forem mikrometastáz. *Neoadjuvatní chemoterapie* také nazývaná jako pooperační chemoterapie, která snižuje rozsah nádoru na ložisko, které lze následně resekovat. Chemoterapie má díky své toxicitě řadu vedlejších účinků. Ty vyplývají především z toho, že poškozuje nejen nádorové buňky, ale i všechny rychle se dělící tkáně jako např.: vlasové váčky, výstelku střeva apod. Naproti tomu principem radioterapie je cílené ozařování nádoru probíhající v opakovaných cyklech, které způsobí nevratné změny ve všech buňkách. Tyto změny vedou ke smrti nádoru, ale i k poškození tkání, které jsou ozařovány zároveň s ním. Ozařování je vždy předem důkladně plánováno tak, aby nádorové buňky dostaly co největší dávku záření, zatímco zdravá tkáň byla co nejvíce ušetřena.

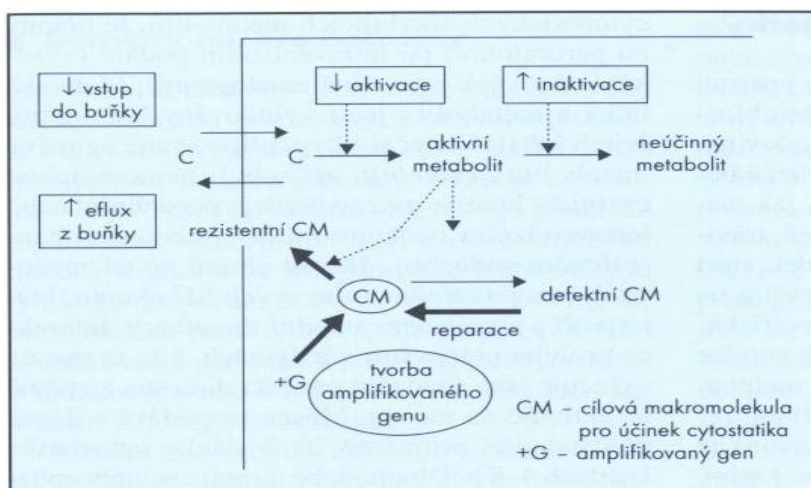
- 4) **Biochemická modulace** – synergismu v tomto případě dosáhneme podáním cytostatika v kombinaci s léčivem bez cytostatických účinků. Následně tak dochází k podpoře účinku cytostatika (např.: 5-fluorouracil).
- 5) **Cesty aplikace** – často přispívají ke zvýšení cytostatického účinku a bezpečnosti. Jako případ lze uvést dlouhodobé kontinuální intravenózní infúze, které svým působením zvyšují účinek cytostatického působení u pomalu rostoucích nádorů a současně se podílejí zejména na snížení toxicity
- 6) **Chronofarmakologie** – se zabývá souvislostmi mezi léky a časem jejich podání, především s ohledem na biorytmy (cirkadiální rytmus), časové změny funkcí organismu, příznaků onemocnění, metabolismu léků apod.
- 7) **Vývoj nových účinných látek** – jako ideální cytostatikum je chápáno takové, které působí přímo do nádoru nebo metastáz, bez vlivu na zdravou tkáň. Mělo by mít selektivní mechanismus účinku bez rizika sekundární rezistence.
- 8) Účinek řady cytostatik koreluje s dobou expozice, to znamená s AUC (plocha pod křivkou plazmatických koncentrací), nežli s dávkou. Důsledkem v tomto případě je, že **účinek žádoucí i nežádoucí lze predikovat pomocí farmakokinetiky**. (Lincová, Farghali a kol., 2007; <http://lecba-rakoviny.cz/lecba-rakoviny>; <http://lekarske.slovniky.cz/lexiconpojem/chronofarmakologie-1>; Eldridge, 2011)

3.3.4 Rezistence na cytostatickou terapii

V praxi rozlišujeme *primární rezistenci*, tj. nedostatečná odpověď na první chemoterapeutickou léčbu, a *sekundární rezistenci* získanou předchozí léčbou. Sekundární rezistence, projevující se perzistujícím maligním onemocněním nebo jeho relapsem, vyžaduje změnu léčebné strategie.

Známa je především mnohočetná rezistence (multidrug resistance – MDR). Jde o expresi transmembránového P-glykoproteinu. Tento typ glykoproteinu aktivně podporuje transport řady buněk ven z buňky např.: barvinkových alkaloidů, antracyklinů, taxanů, podofylotoxinů, mitoxyntronů, a tím snižuje jejich cytostatický účinek. (Martínková a kol., 2007; Lincová, Farghali a kol., 2007)

Obr. 8 Mechanismy, které vyvíjí buňka za vzniku rezistence na cytostatikum (Lincová, Farghali a kol., 2007)



3.3.5 Rozdělení cytostatik

3.3.5.1 Antimetabolity

Působí zpravidla tak, že vytěsňují z metabolických pochodů přirozené látky, které nahrazují chemicky příbuznými cytostatiky. Tímto mechanismem ruší tvorbu bílkovin a nukleových kyselin RNA i DNA. Mezi antimetabolity řadíme:

- analogy kyseliny listové – methotrexát, raltitrexed
- purinové metabolity – merkaptopurin, kladribin, fludarabin, thioguanin
- pyrimidinové antimetabolity – fluorouracil, tegafur, cytarabin, kapecitabin, hydroxymocoviny

- gemcitabin a pemetredex patří mezi nejnovější léčiva ze skupiny antimetabolitů, která ukázala vysokou účinnost v léčbě nemalobuněčného karcinomu plic a která jsou k dispozici v běžné klinické praxi (Hartl, Doležel, Miletín a kol., 2006; Víšek, 2005; <http://drugs.com/drug-class/antimetabolites.html>; Zatloukal, 2005; <http://www.cancerquest.org/-chemotherapy-antimetabolites.html>)

3.3.5.2 Alkylační látky

Působí tlumivě ve všech fázích buněčného dělení. Používají se nejčastěji u zhoubných onemocnění krve tvorných orgánů, ale i u různých druhů maligních tumorů orgánů a tkání. Mezi alkylační látky řadíme:

- dusíkaté yperity – cyklofosamid, ifosamid, chlorambucil, melfalan, mechlorethamin
- deriváty N-nitrosomočoviny – karmustin, lomustin, fotemustin,
- komplexní sloučeniny platiny – cisplatina, karboplatina
- alkylační látky jiné struktury – thiotepa, busulfan, dakarbazin, temozolomid, mitomycin (Hartl, Doležel, Miletín a kol., 2006; Víšek, 2005; <http://livestrong.com/article/115103-alkylating-agents-chemotherapy>)

3.3.5.3 Interkalační látky

Mají schopnost *interkalace*, tj. schopnost vmezeřovat se mezi řetězce DNA a následně blokovat replikaci a transkripci DNA. Řadíme sem antracyklinové glykosidy i deriváty antrachinonů – doxorubicin, idarubicin, epirubicin, mitoxantron, mitomycin. (Slíva, Votava, 2010)

3.3.5.4. Inhibitory topoisomerasy

Blokují rozdělení DNA při mitóze. Inhibitor topoisomerázy II (etoposid) nejčastěji způsobuje rozdělení dvou vláken. Naopak inhibitory topoisomerázy I (topotekan, irinotekan) brání rozdělení dvou vláken – etoposid, topotekan, irinotekan. (Slíva, Votava, 2010)

3.3.5.5. Inhibitory mitózy

Jsou látky původně rostlinného původu pocházející z rodu *Vinca rosea*. Léčiva této skupiny svou vazbou na tubulin způsobují rozrušení buněčných

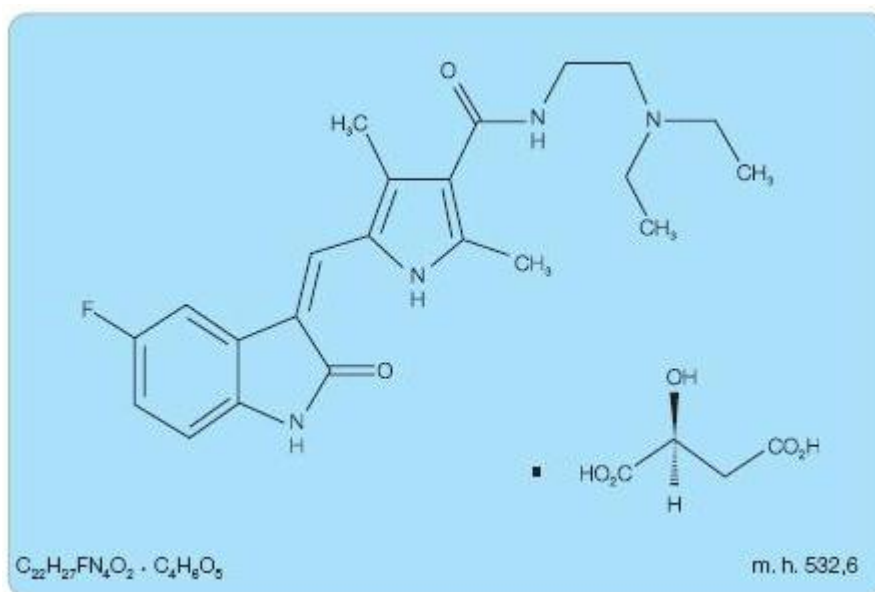
mikrotubulů, které mají rozhodující význam pro správný průběh mitózy. Do této skupiny patří vinca alkaloidy a taxany – vinblastin, vinkristin, vinoreblin, paklitaxel, doketazol. (Slíva, Votava, 2010)

3.3.6 Sunitinib

Sunitinib patří do farmakologické skupiny cytostatik (antineoplastik). Je to biologická látka ze skupiny tzv. malých molekul, tyrozinkinázových inhibitorů. V současné době se využívá ke standardní léčbě metastatického renálního karcinomu (mRCC) a gastrointestinálních stromálních tumorů (GIST). Inhibitory angiotenzinu, včetně inhibitorů enzymu konvertujícího angiotensinu II a blokátory receptorů, jsou široce používány i v terapii hypertenze, onemocnění ledvin a selhání srdce.

Sunitinib se metabolizuje v játrech a interaguje s mnohými léčivými, které se metabolizují pomocí CYP3A4, izoenzymu cytochromu P450. (Brančíková, Adámková Krákorová, 2008; Kocáková, 2008; Keizman a kol., 2011)

Obr. 9 Chemický strukturní vzorec sunitinibu (<http://www.remedia.cz/Archiv-rocniku/Rocnik-2008/3-2008/Sunitinib/e-9q-a3-jp.magarticle.aspx>)



3.3.6.1 Chemické a fyzikální vlastnosti

Sunitinib je chemicky N.[2-(diethylamino)ethyl]-5-[(Z)-(5-fluoro-1,2-dihydro-2-oxo-3H-indol-3-ylidene)methyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxamid. Vyskytuje se ve formě soli jako sunitinib malát.

Sumární vzorec: $C_{22}H_{27}FN_4O_2 \cdot C_4H_6O_5$

Molekulová hmotnost: 532,6 (Brančíková, Adámková Krákorová, 2008; <http://www.rxlist.com/sutent-drug.htm>)

3.3.6.2 Mechanismus účinku, farmakodynamika

Sunitinib je biologická látka ze skupiny tzv. malých molekul – tyrozinkinázových inhibitorů (RTK_s).

Tyrozinkinázy jsou buněčné enzymy umožňující vazbu fosfátových skupin na aminokyselinu tyrozin. Proces zvaný fosforylace slouží jako molekulární vypínač, ale také umožňuje vzájemnou vazbu růstových faktorů, čímž dojde ke spuštění kaskády ze zevního prostředí do jádra buňky. Zdrojem fosfátu je adenosintrifosfát (ATP). Pokud se na tyrozinkinázy místo ATP naváže příslušný inhibitor, nedojde k procesu fosforylace enzymů ani k přenosu signálu. (Brančíková, Adámková Krákorová, 2008)

Mechanismus účinku sunitinibu spočívá ve víceterčovém zásahu do signálních struktur. Velkou předností inhibitorů tyrozinkináz je, že působí cíleně na specifické receptory nádorových buněk. Brzdí neoangiogenezi, čímž snižují krevní zásobení nádorových buněk, snižují schopnost jejich růstu a proliferace a konečně zvyšují apoptózu. (Bureš, Horáček a kol., 2003; Brančíková, Adámková Krákorová, 2008)

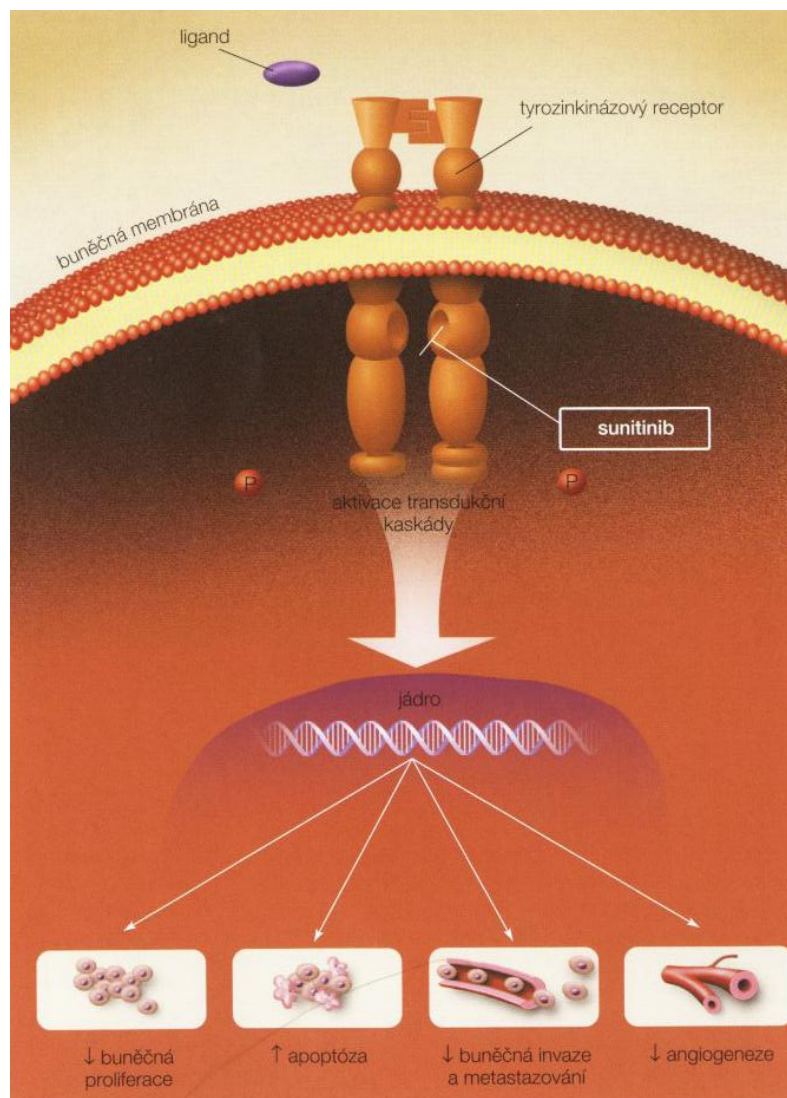
Sunitinib byl identifikován jako inhibitor tyrozinkinázových receptorů (RTKs) :

- 1) pro růstový faktor destiček (PDGFR- α a PDGFR- β)
- 2) receptorů pro vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3)
- 3) receptoru faktoru kmenových buněk (KIT), Fms podobné tyrozinkinázy 3 (FIT-3)
- 4) receptoru kolonie stimulujícího faktoru (CSF-1R)
- 5) receptoru pro neutrofický faktor odvozený od gliálních buněk (RET)

Sunitinib inhiboval fosforylaci na více RTKs (VEGFR-2, PDGFR- β , Kit) *in vivo* v nádorových xenograftech a u některých experimentálních modelů nádorů prokázal inhibici růstu na nádorovou regresi a/nebo zpomalení růstu metastáz. Prokázal schopnost inhibovat *in vitro* růst nádorových buněk exprimujících deregulované cílové RTKs (PDGFR, RET nebo KIT) a rovněž *in vivo* inhibovat PDGFR- β a VEGFR-2-dependentní nádorovou angiogenezi. (Brančíková,

Adámková Krákorová, 2008; Teh, Huang, Ding a kol., 2010;
http://www.medilexicon.com/drugs/sutent_1147.php)

Obr. 10 Zjednodušené schéma mechanismu účinku sunitinibu (<http://www.remedia.cz/Archiv-rocniku/Rocnik-2008/3-2008/Sunitinib/e-9q-a3-jp.magarticle.aspx>)



3.3.6.3 Indikace sunitinibu

Sunitinib u karcinomu ledvin

Sunitinib chápán jako tyrosinkinázový inhibitor, má v porovnání s interferonem alfa ($\text{IFN}\alpha$) vyšší protinádorovou aktivitu a klinickou účinnost u pacientů s pokročilým světlóbuňným karcinomem ledviny (RCC), a to u pacientů všech věkových skupin. Ve studii III. fáze klinického zkoušení se u 750 pacientů s RCC porovnávala účinnost sunitinibu v intermitentním schématu čtyři týdny/dva týdny, pauza oproti léčbě $\text{IFN}\alpha$. Medián přežil bez známek progresu, v případě sunitinibu dosáhl 11 měsíců, u $\text{IFN}\alpha$ to bylo pouze 5 měsíců.

Výsledky klinických studií nám ukazují, že podávání sunitinibu v 1. linii *léčby metastazujícího RCC zlepšuje přežití ve srovnání s jinými léčebnými strategiemi. Rovněž data poukazující na superprioritu sunitinibu nad IFNa* v prodloužení přežívání u nemocných s příznivou i středně dobrou prognózou, tak i se špatnou prognózou. Léčba sunitinibem zlepšuje celkové přežití, přežití bez progresu a míru do objektivní odpovědi na léčbu (Zemanová, Petruželka, 2010; Fínek 2009; Wong, Jarkowski, 2009)

Sunitinib v léčbě gastrointestinálního stromálního tumoru

Gastrointestinální stromální tumory (GIST) jsou vzácné nádory, jejichž incidence se odhaduje na 10-20 případů ze 106 obyvatel. Jak z názvu vyplývá, jsou nejčastěji lokalizovány v tenkém střevě a žaludku, méně často se pak vyskytují v tlustém střevě a jícnu. Za velmi vzácnou lze považovat lokalizaci stromálních tumorů mimo trávicí trubici, v tomto případě se jedná o tzv. EGIST (extragastrointestinální stromální tumory). V 15-50% případů se setkáváme u nemocných GIST současně i s pozitivním nálezem metastáz. Nejobvyklejší místa metastáz u GISTů jsou játra a břišní membrány (peritoneum, mezenterium, omentum), vzácně potom metastazují do lymfatických uzlin, do plic a kostí a také do pánevní oblasti, např.: do vaječníků. Zcela výjimečně jsou metastázy do prsu a svalové tkáně paží. (Kocák, Kocáková, 2008; Belics a kol., 2003; Irving a kol., 2005; Wingen a kol., 2005; Igwilo a kol., 2003)

V případě chirurgického výkonu, který se řadí na první místo v terapii léčby, se nejprve odstraní makroskopicky patrný nádor tak, aby se zajistily okraje tkáně bez nádoru. Primární chirurgická léčba pro metastatické onemocnění je vyhrazena jen pro nemocné s krvácením či obstrukcí.

Jako lék 1. volby je v tomto případě imatinib-mesylát. V případě rezistence nebo intolerance na zmíněný lék je indikována biologická léčba druhé linie sunitinibem. Ten je zpravidla podáván v dávce 50mg/den po 4 týdny, kdy následuje dvoutýdenní přestávka. V případě výskytu nežádoucích účinků léčiva se dávka snižuje na 35mg/den, přičemž doba podávání a interval mezi cykly zůstává nezměněný. V případě vymizení nežádoucího účinku postupujeme jako v předchozím případě. (Kocáková, Kocák, 2008)

Sunitinib na ASCO

Inhibitory tyrozinkinázy se zdají být příslibem pro mnoho onkologických pacientů. Skutečnost, že se jedná o velmi perspektivní skupinu léků, potvrdil v klinických studiích fáze III, jež byly prezentovány na výročním kongresu Americké společnosti pro klinickou onkologii (American Society for Clinical Oncology – ASCO). Zde se potom porovnávala účinnost cytostatik sunitinibu a sorafenibu v léčbě pokročilého hepatocelulárního karcinomu. (<http://www.tribune.cz/clanek/9548>; Cheng, Kan, Lin a kol., 2011)

3.3.6.4 Nežádoucí účinky

I když randomizované studie prokazují poměrně dobrou toleranci, vedlejší účinky jsou nezanedbatelné a jejich spektrum je výrazně odlišné od nežádoucích účinků imunoterapie a chemoterapie.

Sunitinib vykázal toxicitu 3. až 4. stupně u 16 % případů. Mezi nejčastější nežádoucí účinky po podání sunitinibu patří:

- zvýšený TK
- hypotyreóza
- únava
- průjem
- nevolnost a zvracení
- pálení žáhy
- slizniční změny
- syndrom ruka-noha (angl. hand-foot skin reaction) – podávání sunitinibu nebo sorafenibu vyvolávají velmi často tuto reakci zvanou ruka-noha, která se liší od akrálních erytémů pozorovaných při klasické chemoterapii. V prvních 2-3týdnech léčby pozorujeme v místech tlaku ostře ohraničené, erytémové, prosáklé otlaky, které jsou velmi bolestivé.
- třiskovité podnehtové hemoragie
- suchost kůže, alopecie či dystezie kůže hlavy
- sunitinib může také způsobit žluté zbarvení kůže, reverzibilní depigmentaci vlasů a periorbitální edém (Zemanová, Petruželka, 2010;

Cetkovská, Pizinger, Štork, 2010; <http://www.chemocare.com/bio/Sunitent.asp>)

3.3.6.5 Lékové interakce

Současné podávání sunitinibu se silnými inhibitory CYP3A4, např.: ketokonazolem, itraconazolem, klarithromycinem, atazanavirem, indinavirem, nefazodonem, nelfinavirem, ritonavirem, saquinavirem, telithromycinem, vorikonazolem) může zvýšit koncentraci sunitinibu. Podobně jako konzumace grapefruitů nebo pití grapefruitového džusu. Zde je zřejmé, že v případě podávání přípravku s obsahem sunitibu musíme zamezit podávání inhibitorů CYP3A4 nebo snížit dávkování sunitibu a to na denní minimum 37,5 mg.

Současně je nutné se vyhnout i silným induktorům CYP3A4 např.: rifampicinu, dexamethasonu, fenytoinu, karbamazepinu, rifapinu, rifabutinu, rifapentiu, fenytoinu. Pokud to však není možné, musíme zvýšit dávku sunitinibu o 12,5mg (až na 85mg/den).

Vzhledem k těmto faktům by měly být pečlivě zváženy současné medikace při léčbě sunitinibem. Lékové interakce s tímto cytostatikem mohou vést až k závažným vedlejším účinkům, jako je vysoký krevní tlak, krvácení nebo anémie. S ohledem na rizika lékových interakcí bychom měli preferovat léčiva s žádným nebo minimálním potenciálem k indukci nebo inhibici CYP3A4, popřípadě kontaktovat a poradit se svým ošetřujícím lékařem. (Brančíková, Adámková Krákorová, 2008; <http://digestive-system.emedtv.com/sunitinib/drug-interactions-with-sunitinib.html>)

3.3.7 Sunitinib a hypertenze

Podávání sunitinibu a ostatních léčiv z této skupiny má značné toxické účinky na lidský organismus, což může v konečném důsledku vést ke snížení dávek, nebo k úplnému přerušení léčby. Nejčastějším nežádoucím účinkem je vysoký krevní tlak či kožní vyrážky. Na základě výzkumu provedeného na onkologickém oddělení fakultní nemocnice v Helsinkách, byla prokázána korelace sunitinibu, jako možné účinné látky působící při RCC. U pacientů užívajících sunitinib, by měly být monitorovány vedlejší nežádoucí kardiovaskulární účinky, jako je hypertenze a příznaky srdečního selhání. Rizikovou skupinou jsou zejména pacienti s anamnézou ischemické choroby srdeční a srdečních rizikových faktorů. Hlavní roli

v regulaci TK hraje endotel. VEGF nemá vliv jen na angiogenezi, ale i na samotné endoteliální buňky. Sunitinib, který působí přímo na receptoru pro VEGF neovlivňuje jen angiogenezi, ale právě i již zmiňovaný cévní endotel. Podle posledních studií lze usoudit, že snížení nebo neutralizace cirkulujícího VEGF může hrát hlavní roli v indukci hypertenze. Vědci se domnívají, že hypertenzní účinky tyrozinkinázových inhibitorů se mohou uplatňovat přímo na úrovni mikrovaskulárního systému skrz procesy jako ubývání plochy řečiště (což vede ke zvýšení cévního odporu), endotelové dysfunkce a změny v metabolismu NO. (Cohen, Oudard, 2012; Bono a kol., 2011; Chu a kol., 2007)

AH je jedním z nejčastějších nežádoucích účinků při podávání sunitinibu. V průběhu léčby bychom proto měli sledovat hodnoty TK, popřípadě nasadit vhodnou antihypertenzní léčbu. (Kappers a kol., 2012; Krejčíková, 2011)

3.4 IMUNOHISTOCHEMIE

3.4.1 Základní charakteristika imunohistochemie

Imunohistochemie (IHC) je histologická metoda, pomocí které se ve vyšetřovaném vzorku tkáně dokazuje přítomnost určitých antigenů pomocí specifických protilátek s navázanými chemickými sloučeninami. Jde o spojení dvou vědních oborů – imunologie a histologie. Obě metody se věnují důkazu antigenů, antigenních determinant (epitopu), které se nacházejí na buňkách a tkáňových kulturách, pomocí protilátek, které na ně aplikujeme. IHC se využívá k diagnostice řady onemocnění, především pak k odhalení rakoviny. (<http://lekarske-slovniky.cz/pojem/imunohistochemie>; Vašíňová, 2009; http://www.nikoninstruments.com/en_CZ/Information-Center/Immunohistochemistry)

3.4.2 Klinický význam imunohistochemie

- 1) **diagnostický** – jeho podstatou je znázornění specifických antigenů pro určité typy buněk a tkání. V nejasných případech je rozhodující při stanovení diagnózy.
- 2) **prognostický** – je důležitý z hlediska terapie a z další prognózy pacienta. IHC se rovněž používá jako výzkumná metoda. (Vašíňová, 2009)

3.4.3 Historie imunohistochemie

IHC se rozvíjela jako jedna z modernějších metod, která původně vycházela z tzv. histochemie. Původní histochemie vznikala od 30. let 20. století na hranici histologie, analytické chemie a biochemie. Cílem histologie je identifikace a lokalizace chemické látky v místě jejich výskytu v tkáních na úrovni histologické či cytologické.

Základem pro IHC byla možnost kovalentní vazby molekul imunoglobulinů s jinými molekulami, což bylo předmětem výzkumu ve 30. letech 20. století. Ve 40. letech 20. století se zdařil první průkaz antigenů v tkáni pomocí fluoresceinem značené protilátky (imunofluorescenční metoda). Do patologické diagnostiky se tyto techniky dostávaly od 50. let 20. století, postupně byla zlepšována senzitivita, specifita a dostupnost stále širšího spektra metod, k čemuž napomohl i rozvoj molekulárního, proteinového a genového inženýrství. V 70. letech

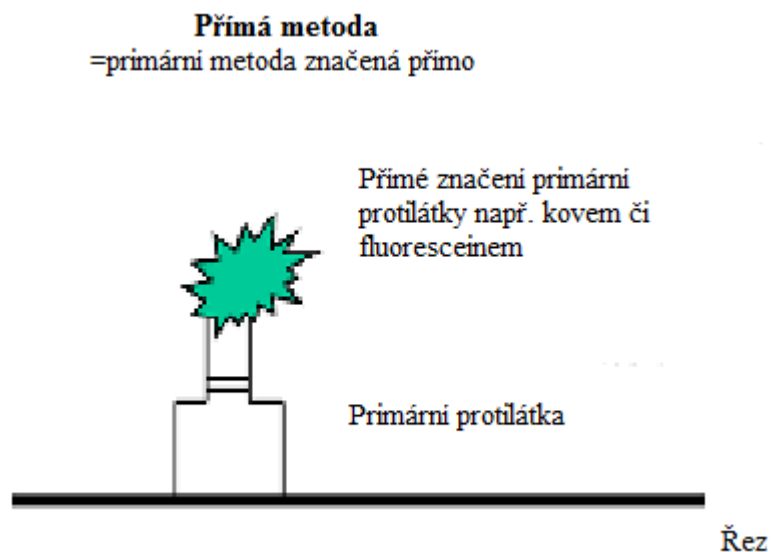
20. století byly postupně připraveny protilátky proti jednomu epitopu tzv. *monoklonální protilátky*. (Tonar, 2002)

3.4.4 Typy imunohistochemických metod

Přímá metoda – jde o nejjednodušší způsob lokalizace antigenu ve tkáni. Tento typ metody lze užít pouze v případě, je-li antigen ve studované tkáni v dostatečně vysoké koncentraci. Primární protilátka je přímo označena fluoresceinem, enzymem nebo kovem, jehož rozmístění v tkáních pak hodnotíme. Konjugované protilátky jsou dostupné pro široké spektrum antigenů a mají využití zejména v nativních řezech. Při použití u parafinových řezů je tato metoda málo citlivá.

Obr. 11 Schéma přímé metody

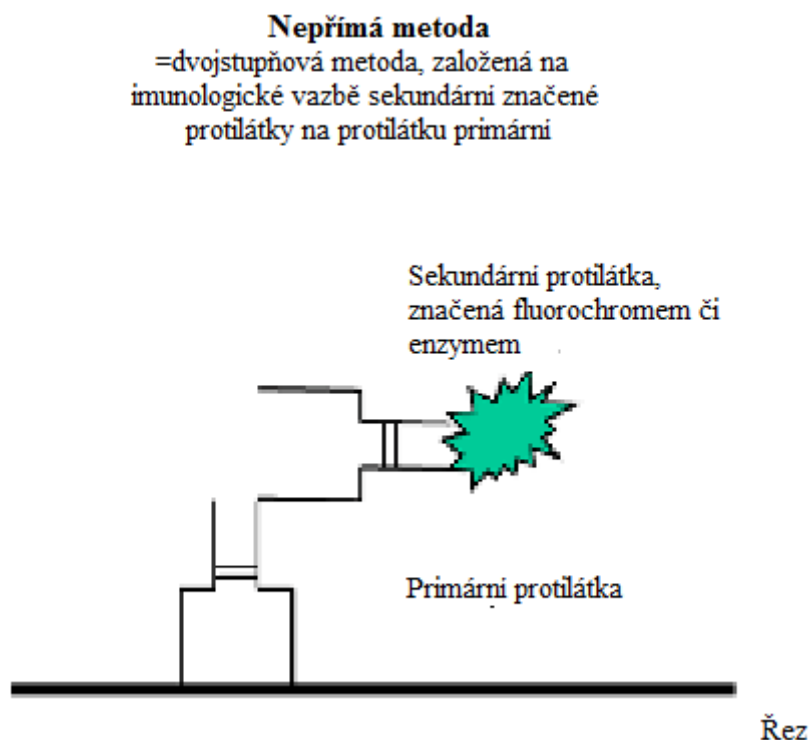
(<http://web.lfp.cuni.cz/histologie/education/guides/ihc/node8.html>)



Nepřímá dvojstupňová metoda – ač jsou tyto metody o poznání komplikovanější než metody přímé, jejich výhodou je jejich mnohem větší citlivost. Na tkáňové řezy se nejprve aplikuje neoznačená protilátka (imunoglobulin) nebo sérum, které jsou specifické proti prokazovanému antigenu, a nazýváme je primární protilátkou. Ve druhé vrstvě nanášíme protilátku proti Fc-fragmentu imunoglobulinů zvířete, které bylo dárce primární protilátky. Druhá (sekundární) protilátka je značená fluorochromem nebo enzymem a imunologickou vazbou se váže na protilátku primární.

Obr. 12 Schéma nepřímé dvojstupňové metody

(<http://web.lfp.cuni.cz/histologie/education/guides/ihc/node8.html>)



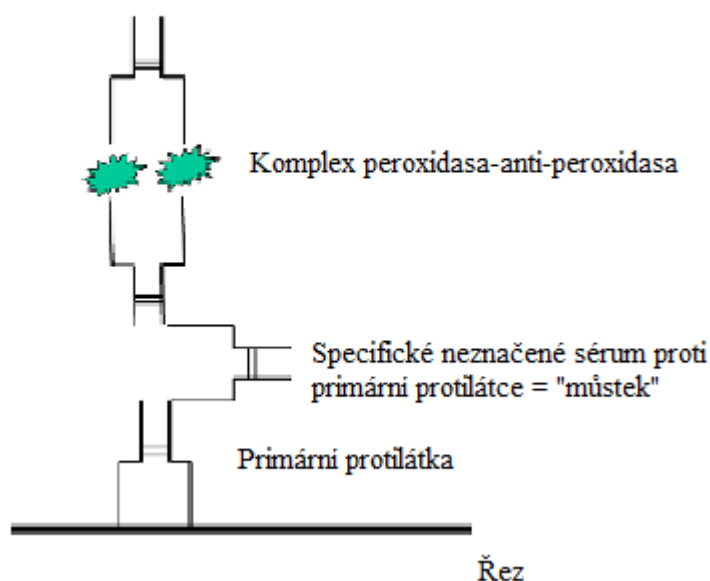
Nepřímé trojstupňové metody – jedná se o tzv. amplifikační metody sloužící k zesílení signálu v případě, že množství molekul v antigenu je nízké. Jak už název napovídá, jedná se o nepřímou trojstupňovou metodu, ve které v první fázi reaguje primární specifické antisérum s antigenem prokazovaným ve tkáni. Ve druhé fázi dochází k aplikaci neznačené specifické protilátky, proti imunoglobulinům zvířete, jehož protilátky se využívají v první a třetí fázi. Tato protilátka je nazývána jako spojovací protilátka, neboť tvoří můstek. V tomto případě je nutno dodávat můstek v nadbytku, aby nebyla vysycena obě ramena. V poslední tedy třetí fázi se nanáší značený komplex např.: **PAP** tj. **peroxidáza-anti-peroxidázový komplex**, využívající rozpustný komplex skládající se ze tří molekul peroxidázy a 2 králičích protilátek proti peroxidáze. Při náhradě peroxidázy alkalickou fosfatázou dostaneme metodu **APAAP** **alkalická fosfatáza-anti-alkalická fosfatáza**. Tohoto postupu se používá v případě použití preparátu, kde je velmi vysoká aktivita endogenní peroxidázy a nelze proto zaručit její úplnou inaktivaci. Další metodou patřící do této skupiny je technika **avidin-biotin komplexu** (ABC metoda). Tato metoda je založena na tvorbě velmi pevné prakticky (ireverzibilní) neimunologické

a druhově nespecifické vazby vaječného glykoproteinu bílku avidinu s vitamínem biotinem. Některá vazebná místa avidinu jsou volná a některá jsou obsazena komplexem biotin-peroxidáza, resp. biotin-alkalická fosfatáza. Volná místa jsou připravena pro navázání biotinylované protilátkové molekuly (můstku). Použitím avidinu získaného z bakterie *Streptomyces avidini*, která poskytuje lepší reakci získáme komplex SABC tj. streptavidin-biotin komplex. Princip těchto metod spočívá v označení sekundární protilátky biotinem a jeho následné vazbě se (strept)avidin-biotinovým komplexem označeným křenovou peroxidázou. Tento typ metody patří mezi nejcitlivější a je velmi rozšířen. (Tonar, 2002)

Obr. 13 Schéma nepřímé trojstupňové metody

(<http://web.lfp.cuni.cz/histologie/education/guides/ihc/node8.html>)

Nepřímá trojstupňová metoda



3.5 STEREOLOGIE

Stereologie je vědní obor používající se ke kvantifikaci dvourozměrných a trojrozměrných struktur pomocí řezů, či projekcí. Zjednodušeně bychom ji mohli popsat jako vědu zahrnující geometrickou analýzu struktur. Jedná se o novější metodu, jejíž základ položili na konci 19. století geologové M.A.Delesse a A.Rosival, od té doby však došlo k velkému pokroku. Stereologické metody

se nejčastěji využívají pro odhady celkového objemu objektu, plochy povrchu objektu, délky lineárních útvarů a počtu částic. Kromě těchto celkových rozměrů je možné stereologii využít pro zjišťování intenzit jako např.: objemový podíl V_v , počet částic v objemu N_v , povrch v jednotce objemu S_v , respektive délka v jednotce objemu L_v . Využití těchto metod je na principu geometrické pravděpodobnosti, tedy výsledek, který získáme, není přesnou hodnotou, ale pouze odhadem, tedy náhodnou veličinou. (Weibel, 1979; R.Jelínek a kol., původní nevydaná skripta, dostupná z: <http://old.lf3.cuni.cz/histologie/materialy/doc/skripta.pdf>)

Ve stereologii se pro výpočet jednotlivých parametrů používají *testovací sondy*. Při výběru testovací sondy platí určitá pravidla jako např.: součet testovací sondy a parametru, který odhadujeme, musí být 3. Pro lepší pochopení lze uvést příklady: pro odhad délky, což je 1-rozměrná veličina, se může použít 2-rozměrná testovací sonda (délka se zjistí pomocí počtu průsečíků plochy roviny). Pro odhad počtu částic, což je 0-rozměrná veličina, se použije až 3-rozměrná testovací sonda jako disektor (počet částic se zjistí pomocí počtu průsečíků disektoru s částicemi a pomocí objektu disektoru). (Gundersen, Bagger, Bendsten a kol., 1988)

Hlavním prvkem pro využití stereologických metod je využití principu *nestranného systematického náhodného výběru*, který nám umožňuje odhadnout měřený parametr bez kvantifikace celého objektu (orgánu), či struktury (části orgánu). V praxi se nestranný systematický náhodný výběr provádí tak, že se nejprve zhotoví série řezů objektem, které budou následně kvantifikovány. První řez série je vybrán zcela náhodně (pomocí generátoru nahodilých čísel a tabulek), bez ohledu na strukturu. Další řezy jsou následně vybrány jedním ze dvou způsobů, buď na základě určité konstantní vzdálenosti T , nebo je vybrán každý x -tý řez od prvního zvoleného řezu. Počet řezů a vzdálenost T mezi řezy nebo číslo x -tého řezu závisí na struktuře objektu, který kvantifikujeme a zvolené chybě měření. Princip nestranného systematického náhodného výběru minimalizuje počet chyb způsobených experimentátorem a především urychluje proces kvantifikace. (Cruz-Orive, 1993)

3.5.1 Vybrané stereologické metody

- odhad plochy v rovině
- odhad objemového, respektive plošného objemu

- odhad objemu
- odhad počtu částic (buněk) v prostoru

Pravidla pro kvantifikaci ve sterologii

- 1) Nutnost mít alespoň 5 experimentálních jedinců ve skupině
- 2) Počet řezů orgánem musí být nejméně 5 (skutečný počet řezů a jejich tloušťka se určí podle složitosti struktury)
- 3) Na jeden řez připadá 10-20 testovacích polí
- 4) Počet zásahů, které provádíme za pomoci testovací sondy, by se měl pohybovat kolem 100-200 bodů, abychom pracovali s chybou odhadu kolem 5% (v potaz musíme brát především složitost struktury, čím složitější struktura, tím větší počet bodů pomoci testovací sondy)

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 MATERIÁL A METODY

4.1.1 Experimentální kmeny zvířat

Experimentální část zahrnovala dva kmeny zvířat a to při dlouhodobém podávání cytostatika sunitinibu (10mg/kg za den v pitné vodě).

Jednalo se o SHR inbrední samce, a WKY potkany, také inbrední samce. Oba druhy zvířat mají stejný genetický základ, jen s tím rozdílem, že WKY potkani jsou normotenzivní.

Pokusné skupiny zvířat

V každé skupině jsme použili 2 podskupiny zvířat a to jak u hypertenzivních potkanů typu SHR, tak i u normotenzivních potkanů WKY. Zatímco jedné podskupině bylo podáváno cytostatikum sunitinib, druhé byla podávána pouze voda. Celkem jsme vytvořili 4 pokusné podskupiny. Každá skupina čítala 6 zvířat, dohromady tento počet tedy činil 24 zvířat.

Stáří u všech zvířat se pohybovalo mezi 2-3 měsíci. Počáteční hmotnost kontrolní skupiny normotenzivních potkanů typu WKY byla 8,51g. U stejné skupiny zvířat, které byl podáván sunitinib byla počáteční hmotnost 5,59g. Průměrná hmotnost u kontrolní skupiny hypertenzivních potkanů typu SHR byla 3,96g. U stejné skupiny zvířat, které byl však podáván od počátku sunitinib byla průměrná hmotnost 3,84g.

4.1.2 Pomůcky a přístroje

- podložní a krycí sklička
- zkumavky a špičky
- chirurgické nástroje – pinzeta, nůžky
- mikropipeta
- váhy
- laminární box
- třepačka
- mikrovlnná trouba
- termostat

- mikrotom
- světelný mikroskop Olympus AX 70 s digitální firewire kamerou Pixelink PL-A642 (Vitana Corp. Ottawa, Kanada)

4.1.3 Farmaka, roztoky, činidla

- aceton (Fagron a.s., Olomouc)
- PBS – fosfátový pufr (*phosphate buffered saline*)
- goat sérum – kozí sérum (Sigma Aldrich, Německo)
- primární protilátka – NOS3 (C-20) (Santa Cruz Biotechnology, USA)
- 3% peroxid vodíku (Fagron a.s., Olomouc)
- sekundární protilátka – Envision anti rabbit (DAKO, USA)
- DAB – diaminobenzidin (DAB substrát-chromogen, DAKO, USA)
- hematoxylin (Verkon s.r.o., Praha)
- aceton-xylen (10:1)
- aceton-xylen (1:10)
- xylen (Lach-Ner,s.r.o., Česká republika)
- Eukitt (Sigma Aldrich, Německo)

4.1.4 Experimentální model

Skupině SHR potkanů, což jsou hypertenzivní potkani byl podáván sunitinib. Druhá skupina zvířat WKY potkani, kteří jsou normotenzivní, sloužila pouze jako kontrola a byla jim podávána pouze voda. Aplikace cytostatika sunitinibu (u kontrolní skupiny zvířat) probíhala denně po dobu 8 týdnů, což v reálu představuje jednou tak delší dobu, než je doporučováno u pacientů. Po těchto 8 týdnech se potkanům nechalo 5dní na jejich zotavení. Poté následovalo další podávání sunitinibu. U SHR potkanů 8 týdnů u WKY potkanů 2 týdny (tedy celkem 16 a 10 týdnů). U WKY potkanů nešlo pokračovat v léčbě sunitinibem, neboť se objevily známky úbytku tělesné hmotnosti a celkové příznaky toxicity.

K usmrcení zvířat došlo po 24 hodinách od podání poslední dávky. (Krejčíková, 2011)

Následně byla odebrána aorta ve svém sinu a zamražena v médiu. Po předepsané době (7-10dní) byla céva nařezána na mikrotomu a po dalším časovém úseku (7-10dní) použita k imunohistochemickému zpracování.

Pomocí této metody jsme sledovali expresi eNOS na aortě a to jak u spontánně hypertenzivních potkanů (SHR), tak u normotenzivních potkanů (WKY) s ohledem na podávání cytostatika sunitinibu.

K detekci jsme využili králičí polyklonální protilátku (rabbit polyclonal antibody) NOS3 (C-20) ve zředění 1/100. Použitím této protilátky jsme sledovali vliv sunitinibu na expresi eNOS u normotenzivních a hypertenzivních potkanů (pod slovem exprese si lze představit proces, kterým je v genu uložená informace převedena v reálně existující buněčnou strukturu nebo funkci).

4.1.5 Metodika EN-VISION

Pracovní postup

Po fixaci preparátu v acetonu se nechala sklíčka 30 minut sušit na vzduchu. Pak byly řezy na 5 minut vloženy do fosfátového pufru (PBS). Než se mohla aplikovat primární protilátka, bylo nutné zablokovat nespecifická vazebná místa pomocí 10% roztoku goat séra – kozího séra (Sigma Aldrich, Německo) ředěného v PBS. Goat sérum se nechalo na tkáň působit po dobu 30 minut.

Teprve v následujícím kroku bylo možné nanést primární protilátku Rabbit polyclonal antibody (králičí polyklonální protilátka) NOS3 (C-20) se používá ve zředění 1/100 (Santa Cruz Biotechnology). Primární protilátka se nechala inkubovat po dobu 1 hodiny. Poté byly řezy dvakrát po dobu 5 minut opláchnuty v PBS.

Endogenní peroxidázovou aktivitu tkáně bylo nutno potlačit použitím 3% peroxidu vodíku (ředěného v PBS), působením po dobu 15 minut. Po oplachu (2x5 minut v PBS) byla nanесena sekundární protilátka Envision anti rabbit (DAKO, USA) na 30 minut. Po oplachu (2x5 minut v PBS) byla provedena vizualizace navázaných protilátek pomocí DAB – diaminobenzidinu (DAB substrát-chromogen roztok, DAKO, USA). DAB působil na tkáň po dobu 45 sekund. DAB způsobí v místě detekce antigenu hnědé zbarvení.

Po oplachu byla jádra buněk dobarvena hematoxylinem. Dále byly řezy zbaveny přebytečné vody v odvodňovací řadě: aceton-xylen (10:1) na 3 minuty, aceton-xylen (1:10) na 3 minuty a xylen (3x2 minuty). Nakonec byla sklíčka zamontována do Eukittu.

Po dokonalém uschnutí preparátů jsme mohli pokračovat v hodnocení preparátů pomocí stereologické metody. Nejdříve bylo nakrájeno 130 řezů o tloušťce 7 μ m. Následně byl proveden referenční systematický náhodný výběr řezů z referenčního objemu, kdy první řez byl vybrán čistě náhodně a poté se vybral každý 10. řez. Ke stereologickému odhadu pro každé barvení bylo tedy vybráno celkem 5 řezů. Následně jsme použili stereologickou metodu tzv. bodové testovací mřížky, která se zvolila tak, abychom napočítali více než 100 průsečíků mezi body sítě a eNOS barvení na cévním endotelu na jednu cévu.

4.2 POUŽITÉ PROGRAMY PRO STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

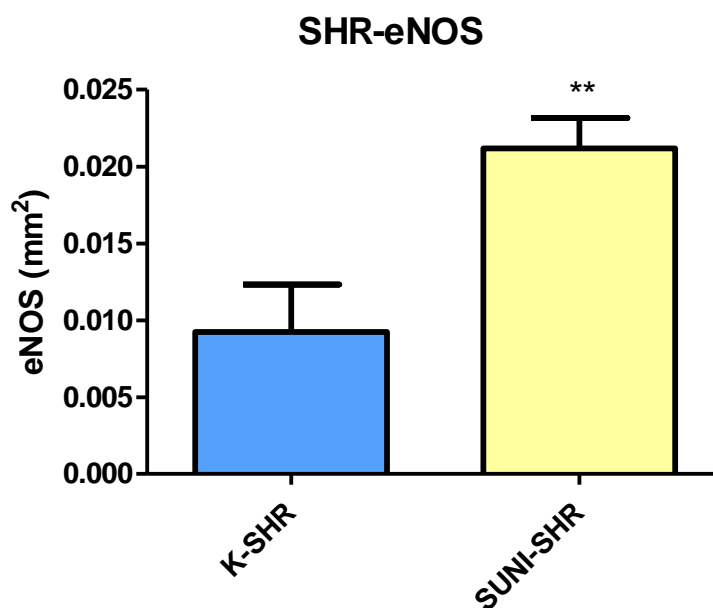
Všechny hodnoty, které byly zaznamenány v grafu jsou předkládány jako S.E.M. n=6 zvířata.

Statistická významnost v rozdílech mezi jednotlivými skupinami zvířat byla posuzována t-testem s využitím GraphPad Prism 5.0 softwaru (GraphPad Software, Inc., San Diego, Kalifornie, USA). P hodnoty menší než 0,05 jsou považovány za statisticky významné. (Mazáčová, 2012)

4.3 VÝSLEDKY

4.3.1 Stereologická analýza exprese eNOS v aortě u hypertenzivních potkanů typu SHR

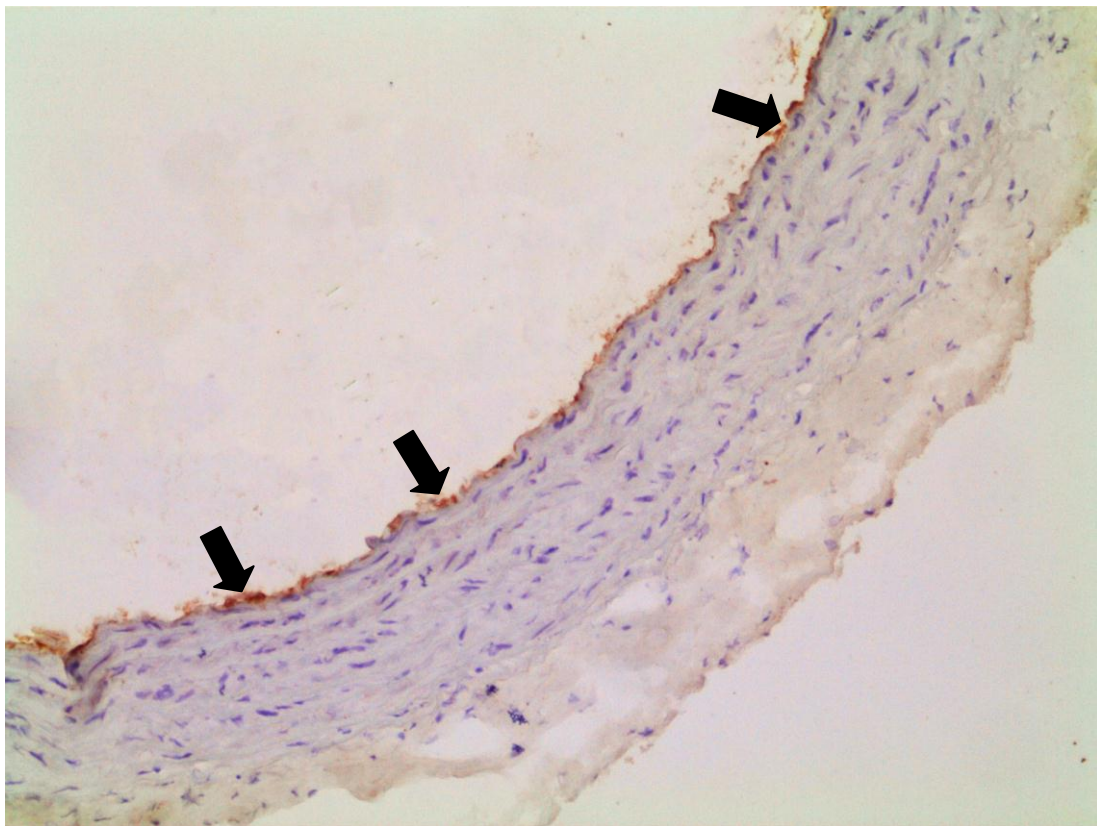
Graf č. 1 Porovnání hypertenzivních inbredních samců typu SHR s podáváním vody a sunitinibu



Byla zaznamenána zvýšená exprese eNOS u hypertenzivních potkanů typu SHR, kterým byl podáván sunitinib ve srovnání s kontrolní skupinou.

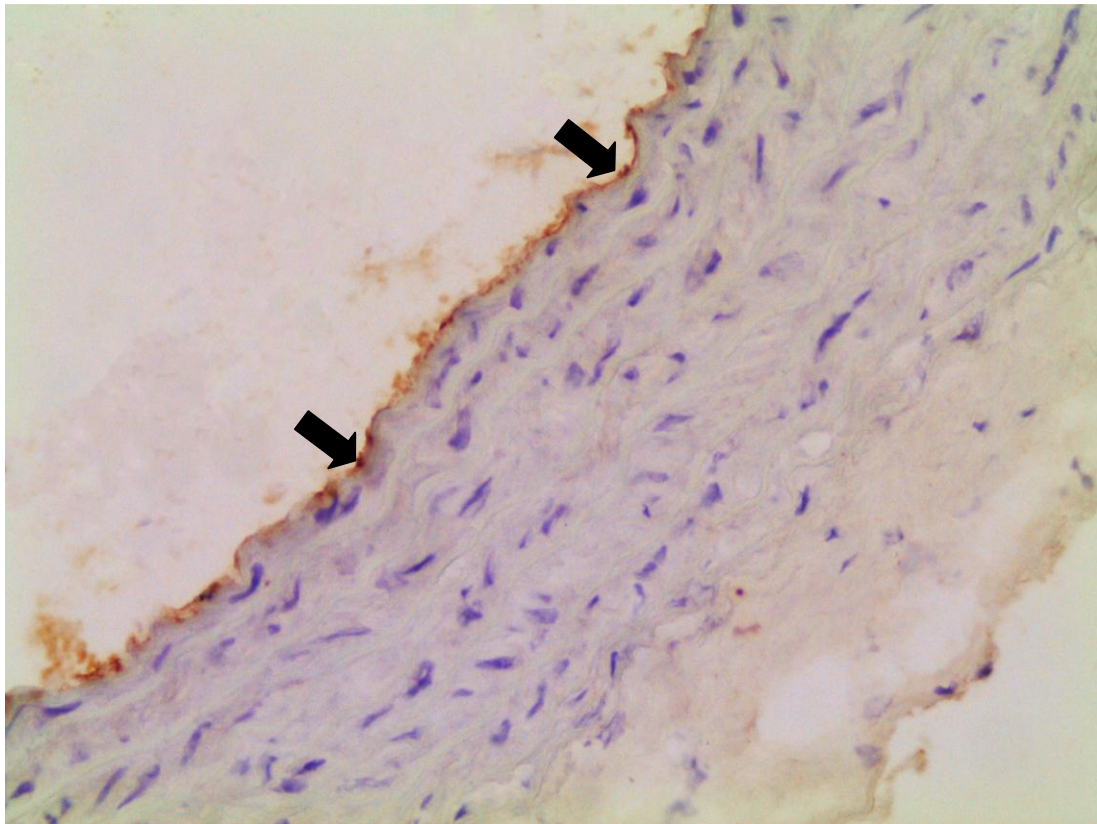
Při porovnání těchto dvou skupin byl nalezen statisticky významný rozdíl $P^{**} < 0,01$.

Obr. 14 Reprezentativní obrázek exprese eNOS u kontrolní skupiny SHR potkanů



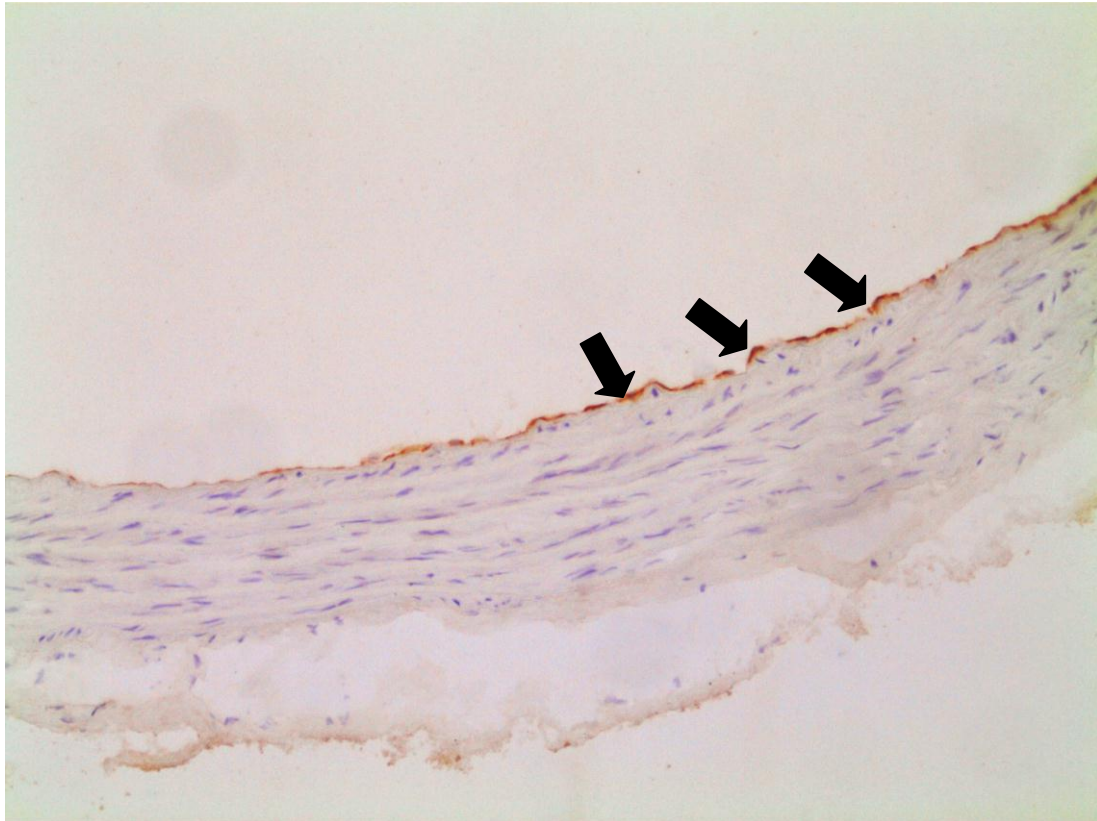
Expres eNOS u kontrolní skupiny zvířat byla detekována pouze na cévním endotelu (šipky). Preparáty jsou dobarveny hematoxylinem. Zvětšení 100x.

Obr. 15 Reprezentativní obrázek exprese eNOS u kontrolní skupiny SHR potkanů



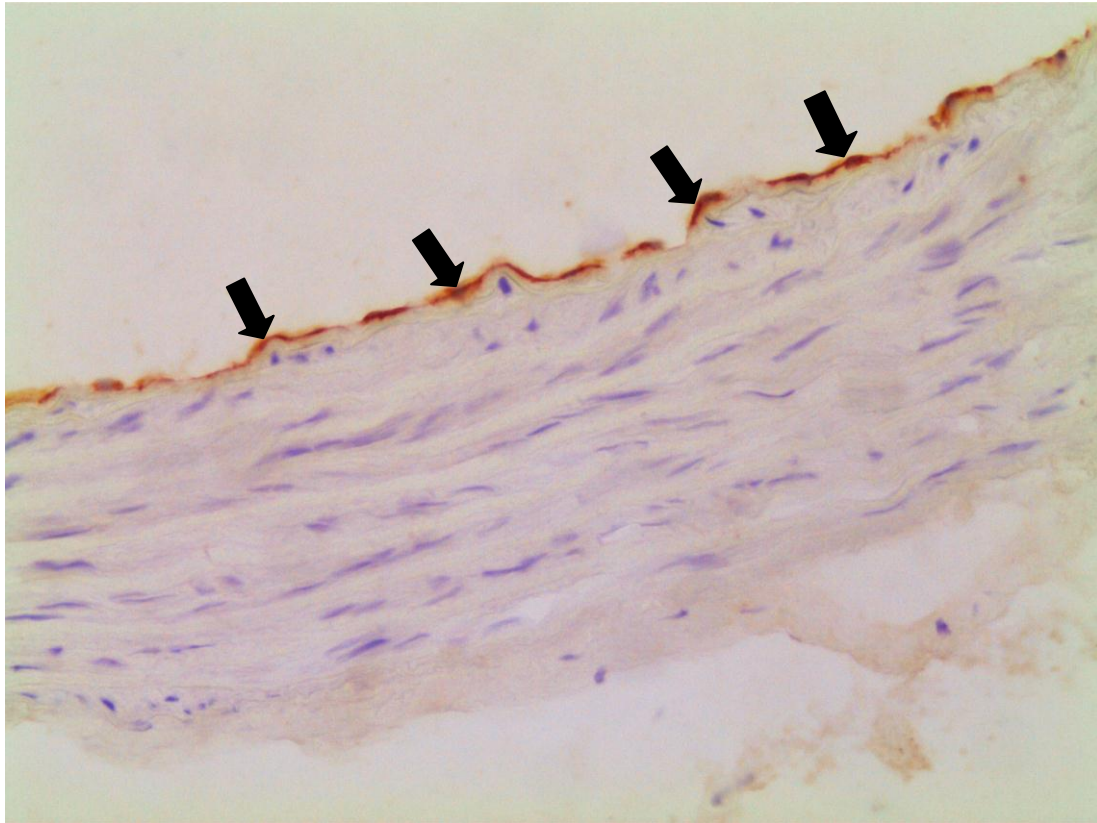
Expres eNOS u kontrolní skupiny zvířat byla detekována pouze na cévním endotelu (šipky). Preparáty jsou dobarveny hematoxylinem. Zvětšení 200x.

Obr. 16 Reprezentativní obrázek exprese eNOS u skupiny SHR potkanů, kterým byl podáván sunitinib



Silná exprese eNOS byla typickým jevem pro skupinu SHR potkanů léčených sunitinibem (šipky). Preparáty jsou dobarveny hematoxylinem. Zvětšení 100x.

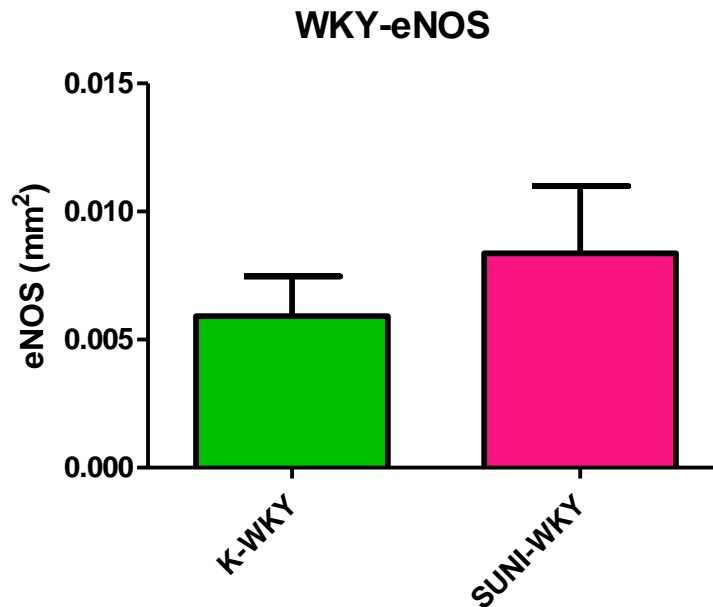
Obr. 17 Reprezentativní obrázek exprese eNOS u skupiny SHR potkanů, kterým byl podáván sunitinib



Silná exprese eNOS byla typickým jevem pro skupinu SHR potkanů léčených sunitinibem (šipky). Preparáty jsou dobarveny hematoxylinem. Zvětšení 200x.

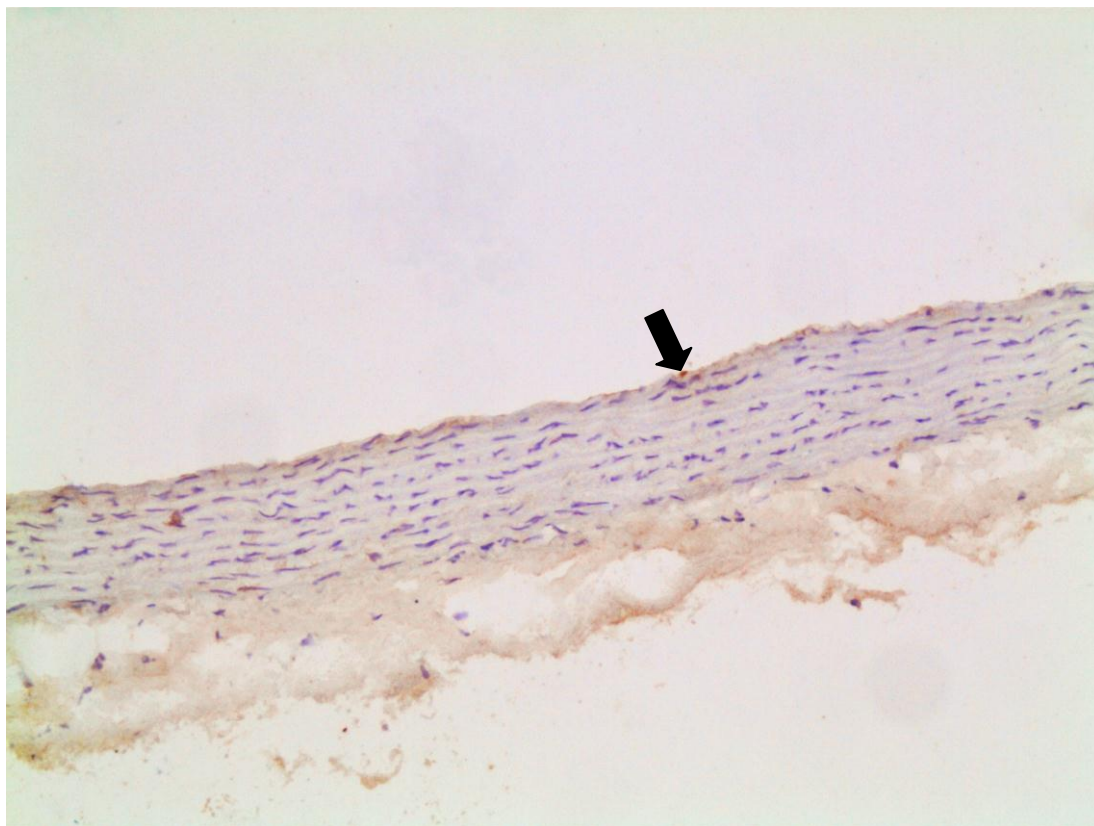
4.3.2 Stereologická analýza exprese eNOS v aortě u normotenzivních potkanů typu WKY

Graf č. 2 Porovnání normotenzivních inbredních samců typu WKY s podáváním vody a sunitinibu



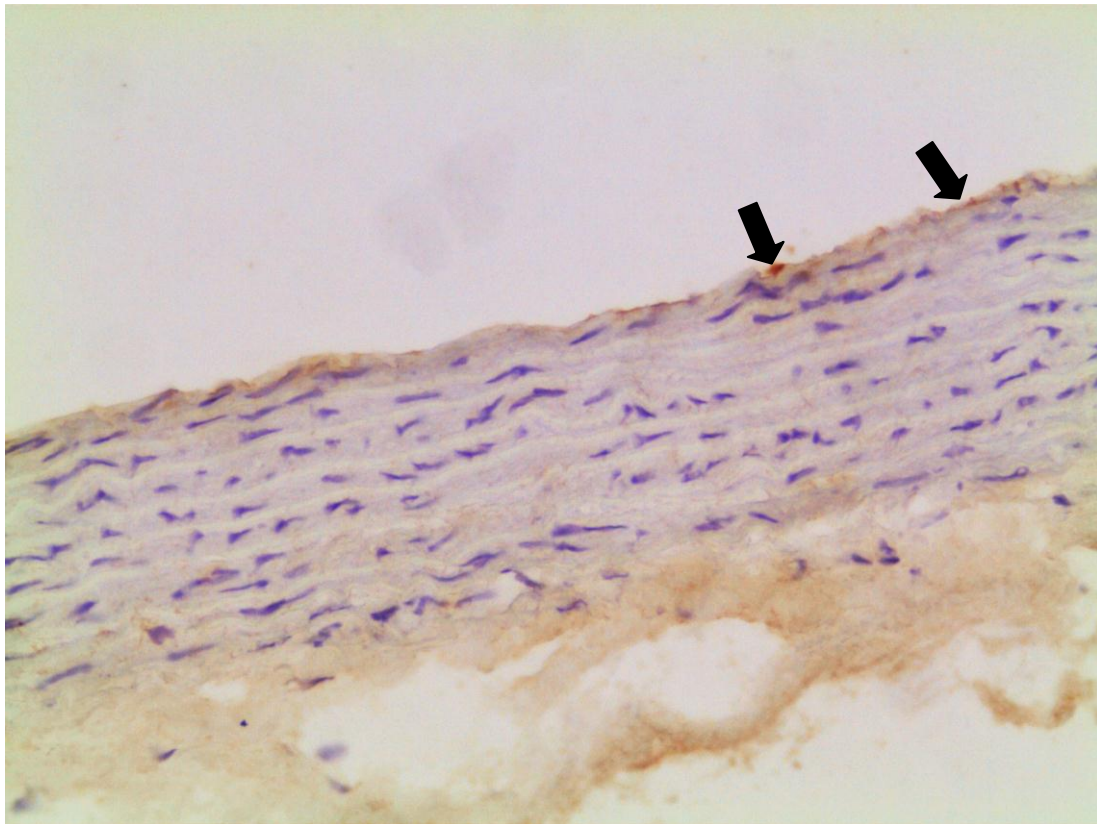
Byť byl pozorován trend ve zvýšení exprese eNOS, statisticky jsme nezaznamenali významný rozdíl u normotenzivních potkanů typu WKY, kterým byla podávána voda a sunitinib.

Obr. 18 Reprezentativní obrázek exprese eNOS u kontrolní skupiny WKY potkanů



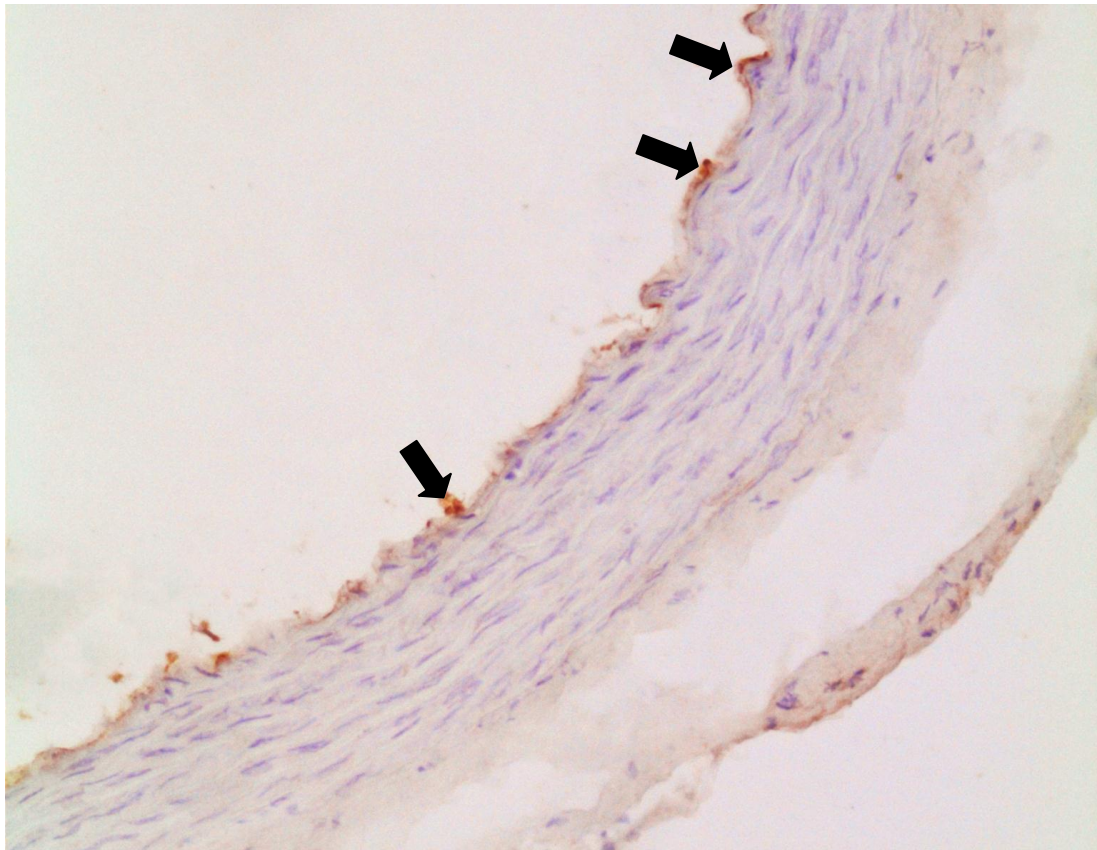
Expres eNOS u kontrolní skupiny zvířat byla detekována pouze na cévním endotelu (šipky). Preparáty jsou dobarveny hematoxylinem. Zvětšení 100x.

Obr. 19 Reprezentativní obrázek exprese eNOS u kontrolní skupiny WKY potkanů.



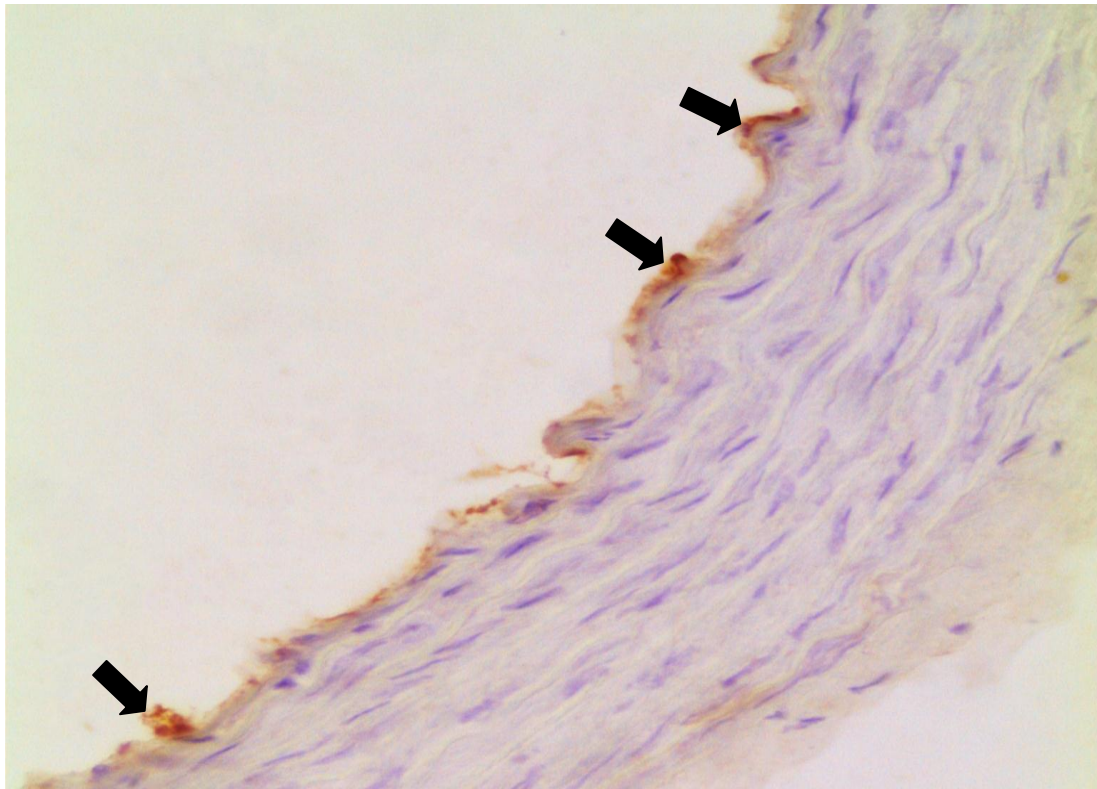
Expres eNOS u kontrolní skupiny zvířat byla detekována pouze na cévním endotelu (šipky). Preparáty jsou dobarveny hematoxylinem. Zvětšení 200x.

Obr. 20 Reprezentativní obrázek exprese eNOS u skupiny WKY potkanů, kterým byl podáván sunitinib



Expres eNOS u normotenzivních WKY potkanů léčených sunitinibem nebyla tolik prokazatelná jako v případě hypertenzivních potkanů typu SHR léčených sunitinibem. Expres eNOS byla detekována pouze na cévním endotelu (šipky). Preparáty jsou dobarveny hematoxylinem. Zvětšení 100x.

Obr. 21 Reprezentativní obrázek exprese eNOS u skupiny WKY potkanů, kterým byl podáván sunitinib



Expres eNOS u normotenzivních WKY potkanů léčených sunitinibem nebyla tolik prokazatelná jako v případě hypertenzivních potkanů typu SHR léčených sunitinibem. Expres eNOS byla detekována pouze na cévním endotelu (šipky). Preparáty jsou dobarveny hematoxylinem. Zvětšení 200x.

5. DISKUZE

Cytostatikum sunitinib je látka ze skupiny malých molekul tzv. inhibitorů tyrozinkinázy. Zpravidla se váže na tyrozinkinázové domény receptorů pro vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGFR), PDGFR, KIT, FMS, CSF, RET, FLT-3. Jeho mechanismus účinku spočívá ve víceterčovém zásahu do signálních drah. Kromě cíleného působení na nádorové buňky má současně i antiangiogenní účinek, čímž snižuje krevní zásobení nádorových buněk, zpomaluje rychlost růstu a v konečném důsledku zvyšuje apoptózu. (Bureš, Horáček a kol., 2003; Brančíková, Adámková Krákorová, 2008; Papaetis, Syrigos, 2009)

Na základě klinických studií byla účinnost sunitinibu prokázána nejčastěji u pacientů s gastrointestinálními stromálními tumory (GIST) a u metastatického renálního karcinomu (RCC). Hlavním cílem sunitinibu jsou tyto receptory tyrozinkináz – receptory pro růstový faktor destiček (PDGFR- α a PDGFR- β), receptory pro vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3), receptory pro růstový faktor kmenových buněk (KIT), Fms podobné tyrozinkinázy 3 (FIT-3), receptory pro kolonie stimulující faktor (CSF-1R), receptory pro neutrofický faktor odvozený od gliálních buněk (RET). (Faivre, Demetri, Sargent, Raymond, 2007; Brančíková, Adámková, Krákorová, 2008)

Působením sunitinibu na inhibici angiogeneze dochází ke zpomalení či úplnému zastavení růstu těchto nádorů. K tomu dochází bloádou signalizační kaskády pro VEGF, která však může být nositelem i dalších případných nežádoucích účinků. Bloádou VEGF může dojít k inhibici aktivity endoteliální NO syntázy (eNOS), což vede k rozvoji nejčastějšího nežádoucího účinku – arteriální hypertenzi. Sunitinib kromě již zmíněné arteriální hypertenzi současně ovlivňuje i srdeční činnost, což může vést v některých případech až k srdečnímu selhání. (Rixe, Billefont, Izzedine, 2007; Gupta, Maitland, 2011; Mena, Pulido, Guillen-Ponce, 2010)

Cílem této diplomové práce bylo popsat a kvantifikovat expresi eNOS, jak u normotenzivních potkanů typu WKY, tak i u hypertenzivních potkanů typu WKY s ohledem na podávání cytostatika sunitinibu. Hlavním úkolem bylo ověřit jeho možný účinek na endotel aorty.

Expres eNOS byla sledována na 130 řezech, z čehož byla detekována pouze na cévním endotelu aorty zkoušených potkanů. Expres byla sledována u obou skupin zvířat, významnější však byla u skupiny SHR inberdních samců, kterým byl podáván sunitinib. Na základě provedené stereologické analýzy byla statisticky významně zvýšena expres eNOS pouze u skupiny hypertenzivních SHR samců, kterým byl podáván sunitinib ve srovnání s kontrolní skupinou.

V této diplomové práci jsme tedy dokázali zvýšenou expresi eNOS u skupiny hypertenzivních potkanů typu SHR, kterým byl od začátku podáván sunitinib ve srovnání s kontrolní skupinou, které se podávala pouze voda. Tento zajímavý výsledek poukazuje na vliv sunitinibu na cévní endotel hypertenzivních potkanů. Otázkou však stále zůstává, co zvýšení exprese může v konečném důsledku znamenat. Na základě zjištěných poznatků lze konstatovat vliv sunitinibu na cévní endotel, nicméně jeho potenciální vaskulární toxicita musí být ověřena testováním dalších markerů endoteliální dysfunkce.

6. ZÁVĚR

Imunohistochemická analýza nám prokázala expresi eNOS pouze v endotelových buňkách aorty.

Na základě provedené imunohistochemické a stereologické analýzy byla exprese eNOS objevena u obou skupin zvířat, jak u hypertenzních SHR inbredních samců, tak i u normotenzivních WKY samců. Statisticky významné zvýšení bylo pozorováno pouze u skupiny SHR, které byl od počátku podáván sunitinib.

Podáváním cytostatika sunitinibu dochází k ovlivnění cévního endotelu, proto bychom měli brát v úvahu jeho potenciálně toxické účinky v cévním řečišti podobně, jako to bylo již popsáno v srdci.

7. POUŽITÁ LITERATURA

- 1) Alkylating Agents in Chemotherapy. *Livestrong.com* [online]. 2011 [cit. 2012-04-10]. Dostupné z: <http://www.livestrong.com/article/115103-alkylating-agents-chemotherapy/>
- 2) Antimetabolites. *Drugs.com* [online]. 2012 [cit. 2012-04-10]. Dostupné z: <http://www.drugs.com/drug-class/antimetabolites.html>
- 3) Antimetabolites. *CancerQuest* [online]. 2011 [cit. 2012-04-10]. Dostupné z: <http://www.cancerquest.org/chemotherapy-antimetabolites.html>
- 4) **ASCHEMANN M. a kol.:** *Kardiologie*. Praha: Galén, 2004, s. 1540, ISBN 80-7262-290-0.
- 5) Antimetabolites. *Drugs.com* [online]. 2012 [cit. 2012-04-10]. Dostupné z: <http://www.drugs.com/drug-class/antimetabolites.html>
- 6) **BELICS Z., CSÁPO Z., SZÁBO I., PÁPAY I., SZÁBO J., PAPP Z.:** Large gastrointestinal stromal tumor presenting as an ovarian tumor. A case report. *J Reprod Med* [online]. 2003, 48(8) [cit. 2012-04-05]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12971151>
- 7) **BERGER J.:** *Buněčná a molekulární biologie*. Havlíčkův Brod: Tobiaš, 1996, s. 121-128. ISBN 80-85808-42-0.
- 8) **BICKLEY L. S., SZILAGYI P. G., BATES B.:** *Bates' guide to physical examination and history taking*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2008, s. 323-344. ISBN 9781605478036.
- 9) **BOHR D. F., SOMLEO A.P.:** *Handbook of physiology: a critical, comprehensive presentation of physiological knowledge and concepts. The cardiovascular system :*

Formerly Section 2: Circulation Vascular smooth muscle. Washington: American Physiological Society, 1980. ISBN 9780683006063.

- 10) **BONO P., RAUTIOLA J., UTRIAINEN T., JOENSUU H.:** Hypertension as predictor of sunitinib treatment outcome in metastatic renal cell carcinoma. *Acta Oncol.* [online]. 2011, 50(4) [cit. 2012-03-21]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21208033>
- 11) **BRANČÍKOVÁ D., ADÁMKOVÁ KRÁKOROVÁ D.:** Sunitinib. *Remedia.* 2008, XVIII., č. 3
- 12) **BUREŠ J. a HORÁČEK J.:** *Základy vnitřního lékařství.* Praha: Galén, 2003, s. 870 ISBN 80-7262-208-0
- 13) **CETKOVSKÁ P., PIZINGER K., ŠTORK J.:** *Kožní změny u interních onemocnění.* Praha: Grada Publishing, a.s., 1. vydání, 2010, s. 107. ISBN 978-80-247-1004-4.
- 14) **CÍFKOVÁ R.:** Léčba hypertenze v těhotenství. *Remedia.* 2007, **XVII. ročník** (č. 3).
- 15) **CLIFF, W. J.:** *Blood. Vessels.* Cambridge, New York: Cambridge University Press, 1976, s.214. ISBN 9780521207539
- 16) **COHEN R. B., OUDARD S.:** Antiangiogenic therapy for advanced renal cell carcinoma: Management of treatment-related toxicities. *Pubmed.gov* [online]. 2012, č. 22327313 [cit. 2012-02-22]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22327313>
- 17) **CRUZ-OLIVE L.M.:** Systematic sampling in stereology. Bull Inter Statis Inst Proceedings 49th Session, Florence. 1993, č. 55(2), s. 451-468

- 18) **ČEŠKA R. a kol.:** *Interna*. Praha 10: TRITON, 2010, s. 140-158. ISBN 9788073874230
- 19) Drug Interactions With Sunitinib. *EMedTV* [online]. 2011 [cit. 2012-04-12]. Dostupné z: <http://digestive-system.emedtv.com/sunitinib/drug-interactions-with-sunitinib.html>
- 20) **ELDRIDGE M. D. Lynn:** What Is Combination Chemotherapy?. *About.com Lung Cancer* [online]. 2011 [cit. 2012-04-10]. Dostupné z: <http://lungcancer.about.com/od/chemotherap1/f/Combination-Chemotherapy.htm>
- 21) **FAIVRE S., DEMETRI G., SARGENT W., RAYMOND E.:** *Molecular basis for sunitinib efficacy and future clinical development*, *Nat Rev Drug Discov*, 2007, s. 734-745
- 22) **FAUCI A.S., BRAUNWALD E., KASPER L. Dennis, HAUSER L. Stephen, LONGO L. Dan, JAMESON L., LOSCALZO J.:** *Harrison's Principles of Internal Medicine, 17th Edition*. New York: McGraw-Hill Medical, 2008., s. 2754, ISBN 978-0071466332
- 23) **FÍNEK J.:** Sunitinib u karcinomu ledviny. *Medical Tribune*. 01. 06. 2009, roč. 5, č. 17.
- 24) **GOLDMAN L. a AUSIELLO D. A.:** *Cecil Medicine: An Expert Consult Title*. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2007, s. 3136, ISBN 9781416028055.
- 25) **GUNDERSEN H. J. G., BAGGER P., BENDSTEN T.F. a kol.:** *The new stereological tools. Disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in patholgical research and diagnosis*. Denmark: APMIS, 1988. ISBN 96:857-881.

- 26) **GUPTA R., MAITLAND M. L.:** *Sunitinib, hypertension, and heart failure: a model for kinase inhibitor-mediated cardiotoxicity*, Curr Hypertens Rep., s. 430-435
- 27) **HARTL J., DOLEŽAL M., MILETÍN M., OPLETALOVÁ V., ZIMČÍK P.:** *Farmaceutická chemie IV*. Praha: Karolinum, 2006, s. 136-155. ISBN 80-246-1169-4
- 28) **CHALLICE C. E., VIRÁGH S.:** *Ultrastructure of the Mammalian Heart*. New York: Academic Press, 1973, s.191. ISBN 9780121700508
- 29) **CHENG A. Y., KANG, LIN D. a kol.:** Phase III trial of sunitinib (Su) versus sorafenib (So) in advanced hepatocellular carcinoma (HCC). *J Clin Oncol* [online]. 2011, č. 29 [cit. 2012-04-12]. Dostupné z: http://www.asco.org/ascov2/Meetings/Abstracts?&vmview=abst_detail_view&confID=102&abstractID=78796
- 30) Chemotherapy Drugs. *Chemocare.com* [online]. 2005 [cit. 2012-04-05]. Dostupné z: <http://www.chemocare.com/bio/Sutent.asp>
- 31) Chronofarmakologie. *Velký lékařský slovník* [online]. 2008 [cit. 2012-04-10]. Dostupné z: <http://lekarske.slovníky.cz/lexikon-pojem/chronofarmakologie-1>
- 32) **CHU T. F. A kol.:** Sunitinib Linked to Heart Failure and Hypertension. *Lancet* [online]. 2007, 370 (9604) [cit. 2012-03-22]. Dostupné z: <http://www.cancer.gov/cancertopics/treatment/sunitinib-cardiotoxicity0108>
- 33) **IGWILO O. C., BYRNE M. P., NGUYEN K. D., ATKINSON J.:** Malignant gastric stromal tumor: unusual metastatic patterns. *South Med J* [online]. 2003, 96(5) [cit. 2012-04-05]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12911195>
- 34) Imunohistochemie. *Velký lékařský slovník* [online]. 2008 [cit. 2012-02-20]. Dostupné z: <http://lekarske.slovníky.cz/pojem/imunohistochemie>

- 35) Imunochemistry. *Nikon* [online]. 2012 [cit. 2012-02-20]. Dostupné z: http://www.nikoninstruments.com/en_CZ/Information-Center/Immunohistochemistry
- 36) **IRVING J. A., LERWILL M. F., YOUNG R. H.:** Gastrointestinal stromal tumors metastatic to the ovary: a report of five cases. *Am J Surg Pathol* [online]. 2005, 29(7) [cit. 2012-04-05]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15958857>
- 37) **JELÍNEK R. a kol.:** Původní nevydaná skripta prof.R.Jelínka a kolektivu. Skripta histologie a embryologie. Dostupné z: <http://old.lf3.cuni.cz/histologie/materialy/doc/skripta.pdf>
- 38) **JOHNSON P. C.:** *The Peripheral circulation*. New York: Wiley, 1978, s.369. ISBN 9780471446378.
- 39) **JUNQUIERO L. C.:** *Základy histologie*. Česká republika: H.a H, 1997, s. 204-218. ISBN 80-85787-37-7
- 40) **KAPPERS M. H., DE BEER V. J., ZHOU Z.:** Sunitinib-induced systemic vasoconstriction in swine is endothelin mediated and does not involve nitric oxide or oxidative stress. *Pubmed.gov* [online]. 2012, č. 59 [cit. 2012-02-22]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22124432>
- 41) **KEIZMAN D., HUANG P., EISENBERGER M. A., PILLI R., KIM J. J., ANTONARAKIS E. S., HAMMERS H., CARDUCCI M. A.:** Angiotensin system inhibitors and outcome of sunitinib treatment in patients with metastatic renal cell carcinoma: a retrospective examination. *Pubmed.gov* [online]. 2011, č. 47 [cit. 2012-02-14]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21600760>
- 42) **KLENER P. a kol.:** *Vnitřní lékařství*, Praha 2006, Galén, s. 137-150, ISBN 80-7262-430-X

- 43) **KLIKA E.:** *Histologie pro stomatology*. Praha: Avicenum, 1988, s. 179-191. ISBN 08-035-88.
- 44) **KOCÁKOVÁ I., KOCÁK I.:** Sunitinib malát(SUTENT) v léčbě gastrointestinálního stromálního tumoru. *Zdravotnické noviny*. 01. 12. 2008, roč. 8, č. 20.
- 45) **KONRÁDOVÁ, UHLÍK, VAJNER:** *Funkční histologie*, 2. vydání, 2000, Jinočany, s.. 115-123 , ISBN 80-86022-80-3,
- 46) **KORDAČ V. a kol.:** *Vnitřní lékařství I* 1. vydání. Praha 1: Avicenum, 1988, s. 470-515. ISBN 0805088.
- 47) **KREJČÍKOVÁ V.:** *IMUNOHISTOCHEMICKÁ ANALÝZA EXPRESE VYBRANÝCH MARKERŮ V EXPERIMENTÁLNÍ HYPERTENZI*. Hradec Králové, 2011. Bakalářská. Univerzita Karlova v Praze Farmaceutická fakulta v Hradci Králové.
- 48) Léčba rakoviny. *Léčba-rakoviny.cz* [online]. 2012 [cit. 2012-04-10]. Dostupné z: <http://www.lecba-rakoviny.cz/lecba-rakoviny>
- 49) **LINCOVÁ D., FARGHALI H.:** *Základní a aplikovaná farmakologie*. Praha: Galén, druhé, doplněné a přepracované vydání, 2007, s. 541-552. ISBN 978-80-7262-373-0
- 50) **MAČÁK J., MAČÁKOVÁ J.:** *Patologie*. Praha 7: Grada Publishing, a.s., 1. vydání 2004, s. 168-169. ISBN 8024707853.
- 51) **MARIEB, ELAINE N., MALLATT J.:** *Anatomie lidského těla*, Brno 2005, s. 544-551, ISBN 80-251-0066-9
- 52) **MARINO Paul L.:** *The ICU Book*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006, s. 1065, ISBN 978-0-7817-4802-5.

- 53) **MARTÍNEK J., VACEK Z.:** *Histologický atlas*. Praha: Grada Publishing a.s., 1. vydání, Praha 2009, s. 11-12. ISBN 978-80-247-2393-8.
- 54) **MARTÍNKOVÁ J. a kol.:** *Farmakologie Pro studenty zdravotnických oborů*. Praha: Grada Publishing, a.s., 1. vydání, 2007, s. 330-331. ISBN 978-80-247-1356-4
- 55) **MAZÁČOVÁ V.** *Vliv Sunitinibu na endoteliální expresi hemooxygenázy I u hypertenzních potkanů*. Hradec Králové, 2012. Bakalářská práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové.
- 56) **MENA A. C., PULIDO E. G., GUILLEN-PONCE C.:** *Understanding the molecular-based mechanism of action of the tyrosine kinase inhibitor: sunitinib*, Anticancer Drugs 2010, s. 3-11
- 57) **NEČAS E. a kol.:** *Patologická fyziologie orgánových systému část I*. Praha: Karolinum, 2006, s. 126. ISBN 9788024606156.
- 58) **NOS3 (C-20):** sc-654. *SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.* [online]. 2011 [cit. 2012-03-22]. Dostupné z: <http://datasheets.scbt.com/sc-654.pdf>
- 59) **PAPAETIS G. S., SYRIGOS K.N.:** *Sunitinib: a multitargeted receptor tyrosine kinase inhibitor in the era of molecular cancer therapies*, BioDrugs 2009, s. 377-389
- 60) **PAULSEN, DOUGLAS F.:** *Histologie a buněčná biologie*, Praha 2004, z angl. originálu Douglas F. Paulsen: *Histology and Cell Biology: Examination and BoardReview* (4. vydání) do češtiny přeložili: Konrádová, V Uhlík, J Vajner, L, s. 156-162), ISBN 80-7319-024-9
- 61) **POVÝŠIL C., ŠTEINER I. a kol.:** *Speciální patologie*. Praha 5: Galén, 2007, s. 28-29. ISBN 9788072624942.

- 62) **RICHARDSON J.B., BEAULINES A.:** The cellular site of actions of angiotensin, *The Cellular Site Of Action Of Angiotension* [online]. 1971(č. 51), 418-432 [cit. 2012-02-11]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2108140/pdf/419.pdf>
- 63) **RIXE O., BILLEMONT B., IZZEDINE H.:** *Hypertension as a predictive factor of Sunitinib activity*, Ann Oncol 2007. s.1117
- 64) **ROSOLOVÁ H.:** Moderní kombinovaná hypertenze, fixní kombinace perindoprilu a indapamidu. *Remedia*. 2011, **XXI.**(č. 2)
- 65) **ŘIHÁČEK I., SOUČEK M., FRÁŇA P., PLACHÝ M.:** Ambulantní monitorování krevního tlaku. *Remedia*. 2008 , **XVIII. ročník** (č.2)
- 66) **SILBERNAGL S., DESPOPOULUS A.:** *Atlas fyziologie člověka*. 3. české. Praha 7: Grada Publishing, a.s., 2004, s. 216-217. ISBN 802470630X.
- 67) **SILBERNAGL S., LANG F.:** *Atlas patofyziologie člověka*. Praha 7: Grada Publishing, spol. s.r.o., Vydání 1. české, Praha 2001, s. 206-207. ISBN 8071699683.
- 68) **SIMIONESCU N.:** Cellular aspects of transcapillary exchange. *Physiological Reviews* [online]. 1983(č. 63) [cit. 2012-02-11]. Dostupné z: <http://physrev.physiology.org/content/63/4/1536.full.pdf+html>
- 69) **SLÍVA J., VOTAVA M.:** *Farmakologie*. Praha: Triton, 2010, s. 162-167. ISBN 978-80-7387-424-7.
- 70) Sutent (Sunitinib malate). *MediLexicon* [online]. May 2011 [cit. 2012-04-05]. Dostupné z: http://www.medilexicon.com/drugs/sutent_1147.php
- 71) **ŠTEJFA M. a kol.:** *Kardiologie*. Praha: Grada Publishing, a.s., 2007, s. 722, ISBN 8024713853

- 72) **TEH B. T., HUANG D., DING Y. a kol.:** The mechanism of action and resistance of sunitinib in RCC. *J Clin Oncol* 28 [online]. 2010, e13606 [cit. 2012-04-05]. Dostupné z: http://www.asco.org/ASCOv2/Meetings/Abstracts?&vmview=abst_detail_view&confID=74&abstractID=52823
- 73) Terapie, cytostatika. *Multimediální trenažér plánování ošetrovatelské péče* [online]. 2010 [cit. 2012-02-20]. Dostupné z: <http://ose.zshk.cz/vyuka/terapie.aspx?tid=88>
- 74) **THORGEIRSSON G., ROBERTSON A.L.:** The vascular endothelium-pathobiologic significance. *Am J Pathol.* [online]. 1978, 93(3), 802-848 [cit. 2012-03-18]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2018350/>
- 75) **TONAR Z.:** 2.1. Základní typy imunohistochemických metod. *2.1. Základní typy imunohistochemických metod* [online]. 12.1.2002 [cit. 2012-03-16]. Dostupné z: <http://web.lfp.cuni.cz/histologie/education/guides/ihc/node8.html>
- 76) **TONAR Z.:** Historie. *1.2 Historie* [online]. 12.1..2002 [cit. 2012-03-12]. Dostupné z: <http://web.lfp.cuni.cz/histologie/education/guides/ihc/node4.html>
- 77) **TROJAN S. a kol.:** *Lékařská fyziologie*. Praha 7: Grada Publishing a.s., 4.vydání, přepracované a doplněné, 2003, s. 203-211. ISBN 80-247-0512-5.
- 78) **VACEK Z.:** *Histologie a histologická technika*. Praha 1: Avicenum, 1972, s. 98-100. ISBN 08-028-72.
- 79) **VAŠÍNOVÁ L.:** *ZAVEDENÍ IMUNOHISTOCHEMICKÉ DETEKCE MIKROMETASTÁZ KARCINOMU PRSU V SENTINELOVÝCH UZLINÁCH POMOCÍ PROTILÁTKY PROTI CYTOKERATINU 19* [online]. Brno, květen 2009 [cit.2012-02-20]. Dostupné z: is.muni.cz/th/215068/lf...

/Imunohistochemie_Lenka_Vasinova.docx. Bakalářská. Masarykova univerzita v Brně, Lékařská fakulta.

- 80) **VÍŠEK V.:** *Vnitřní lékařství obecná část*. Praha: EUROLEX BOHEMIA, s.r.o., 1. vydání, 2005, s. 166-168. ISBN 80-86861-50-3.
- 81) **VLČEK J., FIALOVÁ D. a kol.:** *Klinická farmacie*. Praha 2010: Grada Publishing,a.s., 2010, s. 73. ISBN 9788024731698
- 82) **WAGNER D. D., MARDER V. J.:** "Biosynthesis of von Willebrand Protein by Human Endothelial Cells" Processing and Their Intracellular Localization Steps. *THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY* [online]. 1984, č. 99, 2123-2130 [cit. 2012-03-18]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2113568/pdf/jc9962123.pdf>
- 83) **WALKER R.:** *Velká rodinná encyklopedie lidské tělo*. Praha: Slovart, 2003, s. 148-149. ISBN 80-7209-477-7.
- 84) web interval, Sunitinib na ASCO. *Medcal Tribune* [online]. 2006, roč. 2, č. 33 [cit. 2012-02-13]. Dostupné z: <http://www.tribune.cz/clanek/9548>
- 85) **WEIBEL E. R.:** *Stereological methods, Vol 1. Practical methods for biological morphometry*. Academic Press, 1979.
- 86) **WIDIMSKÝ J. a kol.:** *Hypertenze*. Praha: Triton, 2.rozšířené a přepracované vydání, 2004, s. 518-519. ISBN 80-7254-515-9.
- 87) **WIDIMSKÝ J.:** *Hypertenze pro praktického lékaře*. Jinočany: H&H, 1993 (dotisk) 1. vydání. ISBN 80-85787-07-5.
- 88) **WINGEN C. B., PAUWELS P. A., DEBIEC-RYCHTER M., VAN GEMERT W. G., VOS M. C.:** Uterine gastrointestinal stromal tumour (GIST). *Gynecol Oncol*

[online]. 2005, 97(3) [cit. 2012-04-05]. Dostupné z:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15943997>

- 89) **WONG M. K., JARKOWSKI A.:** Response to sorafenib after sunitinib-induced acute heart failure in a patient with metastatic renal cell carcinoma: case report and review of the literature. *Pharmacotherapy* [online]. 2009, 29(4) [cit. 2012-04-05]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19323623>
- 90) **ZATLOUKAL P.:** Nové antimetabolity v léčbě karcinomu plic. *Remedia* [online]. 2005, 4-5 [cit. 2012-04-10]. Dostupné z:
<http://www.remédia.cz/Clanky/Farmakoterapie/Nove-antimetabolity-v-lecbe-karcinomu-plic/6-L-aV.magarticle.aspx>
- 91) **ZEMANOVÁ M., PETRUŽELKA L.:** Nové možnosti systémové léčby karcinomu ledviny. *Postgraduální medicína*. 05. 03. 2010, roč. 12, č. 3.